

Über b-Nucleinsäure.

Von

R. Feulgen.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. April 1914.)

Nach Kossel¹⁾ kommt die echte Nucleinsäure aus der Thymusdrüse des Kalbes in zwei Modifikationen vor, die mit a und b bezeichnet werden und sich dadurch unterscheiden, daß das Natriumsalz der a-Nucleinsäure in mindestens 5%iger Lösung gelatiniert, das der b-Säure dagegen nicht. Die beiden Körper sollen nach Neumann polymer sein, mithin müßten sie die gleichen Analysenzahlen geben. Durch Erhitzen mit Natronlauge wird die a-Form in die b-Form übergeführt. Darauf beruht auch die von Neumann angegebene Darstellung: Man erhitzt a-nucleinsaures Natrium 2 Stunden lang mit einer Lauge bestehend aus 100 Raumteilen Wasser und 5 Raumteilen 33%iger Natronlauge. Neumann empfiehlt dann,²⁾ die Verwandlung der a-Säure in die b-Säure gleich bei der Darstellung der ersteren vorzunehmen, indem die mit Natronlauge obiger Konzentration verflüssigte Drüsensubstanz nicht, wie bei der Darstellung der a-Säure, $\frac{1}{2}$ Stunde, sondern 2 Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt wird.

Das nach dieser Methode gewonnene b-nucleinsaure Natrium weist aber bereits Zeichen der Zersetzung auf, kenntlich an einem im Verhältnis zum Phosphor zu niedrigen Stickstoffgehalt, sowie an der braunen Farbe, die eine Folge der Zersetzung der Hexosegruppen durch Alkaliwirkung ist. Derartige Braunfärbungen haften der Nucleinsäure sehr fest an, und der Farbstoff wird beim Umfällen mit Alkohol stets wieder adsorbiert. Beim Neutralisieren der alkalischen Reaktionsflüssigkeit mit Essigsäure tritt, nach einigermaßen erheblicher Zersetzung, ein deutlicher Karamelgeruch auf.

¹⁾ Archiv f. Physiologie u. Anatomie, Physiologische Abt. 1894, S. 195.

²⁾ Archiv f. Physiologie, 1899, Suppl., S. 552.

Analytisch erkennt man derartige Zersetzungen sehr scharf an dem Verhalten des Quotienten $N : P$. Es hat damit folgende Bewandnis:

Die Nucleotide der Purinbasen sind gegen Säuren und Alkalien viel unbeständiger als die Nucleotide der Pyrimidin-derivate. Erstere sind aber sehr stickstoffreich (zusammen 10 Atome), letztere stickstoffarm (zusammen 5 Atome). Werden nun die labileren, aber stickstoffreichen Purinnucleotide zerstört, so nimmt der Stickstoffgehalt im Verhältnis zum Phosphorgehalte unter allen Umständen ab, der Quotient $N : P$ wird also kleiner. Da nun derartig halb zerstörte Nucleinsäuren sich mittels der üblichen Alkoholfällung nicht von dem etwa noch unzersetzten Rest trennen lassen, so dokumentieren sich Zersetzungen der Nucleinsäure also stets in einem zu kleinen Werte für $N : P$, gleichgültig, ob nur ein stickstoffhaltiges Bruchstück (Purinbase) oder das ganze dazugehörige Nucleotid abgespalten bzw. zerstört wurde. Niemals hingegen weist eine zersetzte Nucleinsäure einen Wert für das Verhältnis $N : P$ auf, der gleich dem verlangten (1,70) oder gar höher ist. Hierbei ist natürlich die Abwesenheit von freier Phosphorsäure und von freien Purinbasen vorausgesetzt.

Die nach der Neumannschen Methode dargestellte b-Nucleinsäure gibt also, wie erwähnt, einen zu niedrigen Wert für das Verhältnis $N : P$ (z. B. $N = 12,3\%$, $P = 8,0\%$; $N : P = 1,54$, $N = 14,4$, $P = 8,9$; $N : P = 1,62$).

Zu einem ähnlichen Resultate ist auch Kostytschew¹⁾ gekommen, der ebenfalls durch Alkaliwirkung eine b-Nucleinsäure darzustellen versucht hat. Kostytschew fand für Stickstoff 10,16%, für Phosphor 8,48%, $N : P$ also = 1,2; er kommt zu dem Schlusse: «Die beiden Nucleinsäuren sind nicht isomer; und zwar ist die a-Säure stickstoffhaltiger und phosphorärmer als die b-Säure. Es liegt deshalb die Annahme nahe, daß bei der Umwandlung der a-Nucleinsäure in die b-Säure eine Abspaltung der Nucleinbasen stattgefunden hat.»

Unter diesen Umständen könnte es zweifelhaft erscheinen,

¹⁾ Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 545.

ob überhaupt eine b-Nucleinsäure als eventuell polymeres selbständiges Individuum existiert.

Ich habe nun versucht, nichtgelatinierende Nucleinsäure aus der gelatinierenden darzustellen, ohne daß eine eingreifende Zersetzung stattfand. Die Anwendung von Natronlauge sollte dabei aber tunlichst vermieden werden, da sie, wie erwähnt, sehr bald eine Bräunung des Präparates unter gleichzeitiger Phosphorsäureabspaltung hervorruft. Damit man sich ein Bild von der Empfindlichkeit der Nucleinsäure selbst gegen sehr verdünnte (2%ige) Natronlauge machen kann, habe ich a-nucleinsaures Natrium zu 5% in verdünnter Natronlauge, wie sie auch bei der Darstellung der Nucleinsäure verwendet wird (100 ccm Wasser, 5 ccm 33%ige Natronlauge), gelöst, im siedenden Wasserbade erhitzt und von Zeit zu Zeit untersucht, wieviel anorganischer Phosphor in Gestalt von Phosphorsäure sich gebildet hatte.

Die Prozentzahlen bedeuten Prozente des Gesamtphosphors.

Nach	2 Stunden	deutliche Phosphorsäureabscheidung und Bräunung, Bestimmung mißglückt,
»	4	» 25% des Gesamt-P,
»	6	» 35% »
»	14	» 57% »
»	18	» 67% »
»	24	» 97% »

Ich suchte nun nach einem milderen Mittel, um die a-Säure in die b-Säure zu verwandeln. Es zeigte sich, daß durch Erhitzen mit Natriumcarbonat- und Acetatlösung, ja sogar mit reinem Wasser der gewünschte Effekt, wenn auch in längerer Zeit sich erzielen läßt.

Zur Beurteilung des Erfolges mußte nun zunächst eine Methode gefunden werden, mittels welcher das Fortschreiten und Ende des Prozesses verfolgt werden konnte. Es zeigte sich, daß hierzu die Beobachtung der Verflüssigungspunkte einer gelatinierten Lösung von bestimmten Gehalte (5%) vorzüglich geeignet ist.

Die Ermittlung des Schmelzpunktes der Gelatine muß in einem genügend weiten Rohre geschehen, weil in zu engen

Rohren die auch nach dem Schmelzen noch vorhandene erhebliche Viskosität der Flüssigkeit einen zu hohen Schmelzpunkt vortäuschen kann. Zweckmäßig wiegt man 0,2 g des zu untersuchenden Natriumsalzes in einem Reagenzrohr gewöhnlicher Größe ab, übergießt mit 3,8 ccm des Lösungsmittels, versieht mit einem engen Steigrohr und erhitzt im siedenden Wasserbade. Wenn alles gelöst ist, entfernt man durch vorsichtiges Neigen das kondensierte Wasser, und legt das Glas fast horizontal zum Erstarren hin, derart, daß die Flüssigkeit eben den Stopfen berührt. Nach völligem Erkalten stellt man den Schmelzpunkt der Gallerte fest, indem man das Röhr in einem Becherglase mit Wasser langsam erhitzt. Wenige Grade vor dem eigentlichen Schmelzen beobachtet man ein Erweichen der Gallerte, daran kenntlich, daß sich die Oberfläche derselben besonders an den abhängigen Teilen nach dem Innenraume des Glases zu sich vorwölbt. Wenn der Schmelzpunkt erreicht ist, so nimmt diese Deformation stark zu, und es tritt ein Abrutschen der Gallerte von der Rohrwand ein. Dieser Punkt ist sehr scharf und leicht auf einen Grad genau zu ermitteln.

Präparate von nucleinsaurem Natrium, die möglichst schonend, unter Vermeidung langen Eindampfens dargestellt wurden,¹⁾ zeigen z. B. einen Schmelzpunkt von ca. 55°. Zusatz von Natriumacetat setzt den Schmelzpunkt um 20° herauf, Natriumcarbonat dagegen herab. Bekannt ist, daß Essigsäure, und vor allem Natronlauge die Gelatinierfähigkeit vorübergehend vollkommen aufheben können; beim Neutralisieren tritt sie wieder ein. Man findet in der Literatur die Angabe,²⁾ daß α -nucleinsaures Natrium häufig träge oder gar nicht gelatiniere, daß aber Natriumacetat dann die visköse Flüssigkeit in kurzer Zeit in eine Gallerte umwandeln könne. Das letztere ist richtig und hängt damit zusammen, daß Natriumacetat den Schmelzpunkt des nucleinsauren Natriums so außerordentlich erhöht.³⁾ Gelatiniert jedoch eine 5%ige Lösung von

¹⁾ R. Feulgen, Diese Zeitschrift, Bd. 90, S. 261.

²⁾ Kostytschew, Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 549.

³⁾ R. Feulgen, ebenda, S. 270.

nucleinsaurem Natrium nicht von selbst, so liegt eben der Schmelzpunkt schon unterhalb der Zimmertemperatur und dies ist ein sicherer Beweis, daß keine a-, sondern zum großen Teile b-Säure vorliegt; denn 5%ige Lösungen von einwandfreiem a-nucleinsaurem Natrium bilden bei Zimmertemperatur stets eine feste Gallerte von einem nicht unter 50° liegenden Schmelzpunkte.

Durch die Methode der Schmelzpunktbeobachtung wird es in einfacher Weise möglich, die Umwandlung der a-Säure in die b-Säure direkt zu verfolgen. Zu diesem Zwecke wurden Reagenzrohre in der beschriebenen Weise mit nucleinsaurem Natrium und dem Lösungsmittel, das auf seine Wirkung geprüft werden soll, beschickt und in das siedende Wasserbad versenkt; von Zeit zu Zeit wurden die Rohre herausgenommen, und die Schmelzpunkte ermittelt. Es zeigte sich folgendes:

I.

Erhitzen mit Wasser.

Dauer in Stunden	Fp.
0	60°
1/2	58,5°
1	57,5°
2	56°
4	53°
8	50°
15	40°

II.

Erhitzen mit Normal-Natriumcarbonatlösung.

Fp. mit Wasser 60°.

» » natr. carb. 56°.

Dauer in Stunden	Fp.
0	56°
1/2	55°
4	46°
10	29°

Erhitzen mit 20%iger Natriumacetatlösung.

Fp. mit Wasser 54°.

» » natr. acet. 71°.

Dauer in Stunden	Fp.
0	71°
1	69°
3	66°
10	57°

Man sieht, daß sich ein Herabsetzen des Gallertschmelzpunktes auf verschiedene Weise erzielen läßt. Durch Anwendung von höheren Temperaturen im Drucktopfe lassen sich die Zeiten zwar abkürzen, doch treten dann auch leicht Zersetzungen auf. Die oben angegebenen Versuche wurden nicht bis zu Ende, d. h. bis zur vollkommenen Verflüssigung, durchgeführt, weil sich herausstellte, daß eine andere Methode weit besser geeignet ist, die a-Nucleinsäure in die b-Form zu verwandeln. Es wurde nämlich gefunden, daß durch langdauerndes Erhitzen der vollkommen trocknen Substanz auf 100—110° eine völlige Umwandlung des a-nucleinsauren Natriums sich erzielen läßt. Diese Tatsache legte den Gedanken nahe, daß die b-Säure aus der a-Säure durch Wasserabgabe entstehen kann.

Um diese Frage zu beantworten, mußte zunächst das Verhalten des nucleinsauren Natriums beim Trocknen untersucht werden.

Im hohen Vakuum (0,01 mm) über Phosphorpentoxyd bei kühler Zimmertemperatur (15°) nahm lufttrockenes stauendes nucleinsaures Natrium innerhalb von 18 Stunden 15% an Gewicht ab. In der feuchten Kammer werden diese 15% Wasser binnen einer Stunde wieder aufgenommen; beim Liegen in der Luft unseres Laboratoriums betrug die Gewichtszunahme der exsikkatortrocknen Substanz anfangs ca. 1% pro Stunde, später weniger, bis das ursprüngliche Gewicht wieder erreicht war. In der feuchten Kammer vermag lufttrocknes nucleinsaures Natrium ein mehrfaches seines Gewichtes an Wasser aufzunehmen, wobei es stark quillt. Der Wassergehalt des nucleinsauren Natriums ist also, wie der vieler anderer organischer Stoffe, in weiten Grenzen abhängig vom Sättigungsdefizit des Raumes, in dem es gelegen hat. Wird nucleinsaures Natrium, welches bei Zimmertemperatur mehrere Tage lang einigermaßen bis zur Konstanz getrocknet war, im Hochvakuum bei 60° weiter getrocknet, so gibt es noch etwa 3% Wasser ab, ohne daß seine Gelatinierfähigkeit eine Einbuße erleidet. Erhöht man die Temperatur auf 100°, so werden wiederum etwa 3% Wasser abgegeben, zugleich

aber sinkt der Gallertschmelzpunkt von 54 bis auf 45°. Nach 2tägigem Erhitzen auf 110° lag der Gallertschmelzpunkt schon bei Zimmertemperatur, während wiederum eine Gewichtsabnahme von fast 3% zu konstatieren war.

Es findet also beim Erwärmen auf höhere Temperaturen eine kontinuierliche Wasserabgabe statt, die sich bis zur beginnenden Zersetzung der Substanz erstreckt, sodaß eine Beziehung zwischen Wasserabgabe und Umwandlung der a- in die b-Form nicht sich herleiten läßt. Trotzdem ist das Erhitzen der Trockensubstanz auf höhere Temperaturen die beste Methode zur Darstellung der b-Nucleinsäure.

Darstellung des b-nucleinsauren Natriums.

a-nucleinsaures Natrium wird in offener Schale erst mehrere Stunden bei etwa 60°, dann 24 Stunden bei 100° getrocknet und endlich 4 Tage auf 110° im Toluölschrank erhitzt. Das ganz schwach gelblich gefärbte Präparat wird zu 5% in Wasser gelöst und unter Anwendung von etwas Natriumacetat mit dem doppelten Volumen Alkohol wieder ausgefällt und unter Alkohol entwässert.

0,2022 g Substanz: 18,6 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl).

0,1179 „ „ : 7,43 „ n_{10} -Lauge (Neumann).

Gef.: N = 12,90%; P = 7,43%; N : P = 1,74.

$C_{45}N_{15}P_4H_xO_yNa_4$. Ber.: „ = 1,70.

Reindarstellung der freien b-Nucleinsäure.

Zur Reindarstellung der b-Nucleinsäure eignet sich vorzüglich die Fällung mit Krystallviolett, weil das gebildete nucleinsaure Krystallviolett in Methylalkohol löslich ist, und eine erhebliche Menge von Verunreinigungen ungelöst zurückbleiben.¹⁾ Aus der methylalkoholischen Lösung kann dann die freie b-Nucleinsäure leicht und schonend mittels Salzsäure ausgefällt werden, während das Chlorid der Farbbase (Krystallviolett) in alkoholischer Lösung bleibt. Ich empfehle folgende Arbeitsweise:

¹⁾ R. Feulgen, Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 326.

a-nucleinsaures Natrium wird, wie oben beschrieben, getrocknet und durch Erhitzen auf 110° in das Natriumsalz der b-Säure übergeführt. Zur Darstellung des Farbsalzes kommt die doppelte Menge Krystallviolett in Anwendung. Das nucleinsaure Natrium wird zuerst in 5%ige wässrige Lösung gebracht (wobei konstatiert wird, daß die Flüssigkeit auch bei 0° nicht gelatiniert) und mit dem doppelten Volumen Alkohol unter Anwendung von etwas Natriumacetat gefällt. Die Fällung nimmt man in einem Kolben vor; wird dieser kräftig geschüttelt, so legt sich der ausgefallene Körper als teigige Masse an die Gefäßwand an. Man läßt einige Stunden absitzen, gießt die Mutterlauge ab, läßt gut abtropfen und löst den Niederschlag zu einer etwa 1%igen Lösung auf. Die doppelte Menge Krystallviolett wird zunächst auf dem siedenden Wasserbade zu einer etwa 10%igen Lösung aufgelöst, und die Flüssigkeit dann in die 9fache Menge Wasser gegossen, sodaß auch hier eine 1%ige Lösung entsteht. Die Fällung geschieht nun derart, daß man die Lösung des nucleinsauren Natriums in sehr dünnem Strahle mittels Tropftrichters unter Turbinieren in die Farblösung hineinfließen läßt.¹⁾ Man läßt bis zum nächsten Tage stehen; die Mutterlauge wird dann vorsichtig dekantiert, und der Niederschlag auf einem sehr geräumigen Faltenfilter mit viel Wasser ausgewaschen. Endlich durchstößt man das Filter, spritzt den Niederschlag in ein Becherglas, saugt über einem gehärteten Filter an der Pumpe ab, und trocknet im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur.

Das vollkommen trockene Farbsalz wird jetzt unter Erwärmen zu 5% in Methylalkohol gelöst, von ungelösten Verunreinigungen abzentrifugiert, und aus der methylalkoholischen Lösung die freie b-Nucleinsäure mit Salzsäure gefällt. Man wende soviel doppelt Normalsalzsäure an, als man Farbnucleinat in Lösung gebracht hat.

Die ausgefallene freie Nucleinsäure wird auf einem Faltenfilter abfiltriert, mit schwach essigsauerm Alkohol ausgewaschen und mit Alkohol in einen Kolben hineingespritzt. Dieser wird jetzt unter heftigen Umschwenken über freier Flamme

¹⁾ Vgl. R. Feulgen, Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 309.

vorsichtig erwärmt, wodurch eine festere Koagulation der Nucleinsäure hervorgerufen wird, sodaß das Präparat an der Saugpumpe besser filtriert. Man saugt jetzt über einem gehärteten Filter ab, wäscht gut mit Alkohol und dann mit Äther nach und trocknet vollends im Exsikkator über Schwefelsäure unter vermindertem Druck. Das Trocknen muß sehr sorgfältig geschehen, da sich die freie Nucleinsäure sonst zersetzt. Am besten wird sie noch mehrere Tage über Natronkalk im Exsikkator aufgehoben, um mit Sicherheit alle flüchtige Säure zu entfernen. Das so dargestellte Präparat ist infolge seiner Herkunft und infolge der intensiven Färbekraft des Krystallvioletts noch blau gefärbt, was für die Analyse aber ohne Belang ist. Vollkommen farblos erhält man es, wenn man aus der freien Säure durch Auflösen in verdünnter Natronlauge das Natriumsalz bildet und dieses einigemal aus Wasser mit Alkohol umfällt. Freie Säure lufttrocken:

0,2022 g Substanz: 22,4 ccm n_{10} -Säure.

0,2010 » » : 22,5 » » (Kjeldahl).

0,1057 » » : 17,5 » $n_{1/2}$ -Lauge.

0,0994 » » : 16,5 » » (Neumann).

0,2618 » » : 0,3598 g CO_2 .

Gef.: N = 15,51%, 15,68%; P = 9,18%, 9,19%; C = 37,5%.

$\text{C}_{43}\text{N}_{15}\text{P}_4\text{H}_x\text{O}_y$. Ber.: N : P = 1,70; C : P = 4,15.

Gef.: » = 1,70; » = 4,08.

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln aus der „Gräfin Bose-Stiftung“ ausgeführt.