

Zur Darstellung der Nucleinsäure aus Kalbsthymus.

Von

R. Feulgen.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. März 1914.)

Die echte Nucleinsäure der Thymusdrüse des Kalbes wird jetzt allgemein nach dem Neumannschen Verfahren dargestellt.¹⁾ Diese Methode beruht darauf, daß die zerkleinerte Drüse mittels Natronlauge verflüssigt, dann durch Neutralisieren mit Essigsäure die Alkalialbuminate entfernt, und endlich durch Fällen mit Alkohol das Natriumsalz der Säure gewonnen wird. Im einzelnen verfährt Neumann folgendermaßen:

1 kg reinpräparierte Kalbsthymus wird durch Kochen mit Wasser gehärtet und nach dem Zerkleinern in der Fleischhackmaschine mit 2 l Wasser, dem vorher 200 g Natriumacetat sowie 100 ccm 33%ige Natronlauge zugesetzt wurden, $\frac{1}{2}$ Stunde im siedenden Wasserbade am Rückflußkühler erhitzt. Dann wird mit Essigsäure neutralisiert, das Filtrat auf $\frac{1}{2}$ l eingedampft, und der gesuchte Körper mit Alkohol gefällt. Nach ein- bis zweimaligem Umfällen aus Wasser mit Alkohol erhält man das gelatinierende α -nucleinsäure Natrium von der von H. Steudel²⁾ angegebenen Zusammensetzung. Wird diese Methode genau nach der Vorschrift ausgeführt, so bekommt man das Präparat mit Leichtigkeit biuretfrei.

Zu dieser ursprünglichen Neumannschen Vorschrift ist nun folgendes zu bemerken:

1. Gibt man das zerkleinerte Drüsenmaterial in das Wasser, welches vorher mit der Natronlauge alkalisch gemacht war, so entstehen stets größere Knoten, die unter der Einwirkung der Natronlauge außen langsam zu einer sehr zähen schleimigen

¹⁾ Archiv f. Physiologie, 1899, Suppl., S. 553.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 499.

Masse erweichen. Derartige Brocken lösen sich sehr schwer, und es kommt häufig vor, daß nach der vorgeschriebenen Zeit von $\frac{1}{2}$ Stunde noch nicht alles verflüssigt ist. Man muß in einem solchen Falle länger erhitzen, erhält dann aber ein Präparat, dessen 5%ige gelatinisierte Lösung einen sehr niedrigen Schmelzpunkt aufweist, indem durch längeres Erhitzen mit Natronlauge (nach Neumann vollständig in 2 Stunden) das gelatinierende Salz der a-Säure in das nichtgelatinierende der b-Säure verwandelt wird. Man ändert also die Methode zweckmäßig derart ab, daß man erst die zerhackte Drüsenmasse mit heißem Wasser zu einem gleichmäßigen Brei verrührt, diesen auf höhere Temperatur bringt und erst dann die Natronlauge zusetzt. So tritt die Lösung stets fast momentan ein, und man braucht bei der Dauer der Erhitzung keine Rücksicht auf die sonst unregelmäßige Verflüssigung zu nehmen.

2. Neumann verlangt in seiner Vorschrift, daß man die Verflüssigung unter Zusatz von 2 l Wasser auf je 1 kg Drüsen-substanz vornehme, und die erhaltene Lösung nach dem Neutralisieren mit Essigsäure dann auf $\frac{1}{2}$ l eindampfe. Dieses Eindampfen mag angehen, solange es sich um die Darstellung geringer Mengen Nucleinsäure handelt. Will man aber z. B. von 4 kg Thymus ausgehen, so müßte man etwa 12 l auf 2 l eindampfen. Dies ist aber sehr lästig und dauert mehrere Tage, einerseits, weil die Flüssigkeit sehr zur Hautbildung neigt (die allerdings durch Anwendung eines selbsttätigen Rührers eingeschränkt werden kann), andererseits aber, weil gegen Schluß der Operation eine derartige Konzentration des reichlich vorhandenen Natriumacetats stattgefunden hat, daß das Wasser nur sehr langsam verdunstet. Ein solches langdauerndes Erhitzen ist ebenfalls imstande, die a-Säure in die b-Säure zu verwandeln. Das Eindampfen in einem Vakuumapparate führte aus weiter unten anzugebenden Gründen zu einem Mißerfolge.

Es lag daher der Gedanke nahe, die Verflüssigung ohne Anwendung größerer Mengen Wassers vorzunehmen und die resultierende Flüssigkeit ohne Eindampfen gleich mit Alkohol zu fällen. Dies ist leicht möglich unter Berücksichtigung des folgenden: Schon Neumann empfahl, die Drüsen

vor dem Zerkleinern in der Fleischhackmaschine durch Kochen mit Wasser zu härten, lediglich aus dem Grunde, weil sie sich dann leichter durch die Fleischhackmaschine treiben lassen. Durch dieses Härten nimmt das Gewicht der Drüsensubstanz um etwa 30—50% ab, weil durch die Koagulation des Eiweißes Wasser ausgepreßt wird. Setzt man nun dieses Wasser wieder der zerhackten Drüsenmasse zu, so entsteht ein Brei, der sich auch ohne weiteren Zusatz von Wasser mit Natronlauge (deren Menge natürlich entsprechend verringert wird) verflüssigen läßt. Das nach diesem abgekürzten Verfahren gewonnene nucleinsäure Natrium war aber merkwürdigerweise selbst durch wiederholtes Umfällen mit Alkohol nicht biuretfrei zu bekommen; entsprechend gab es bei der Analyse auch stets zu hohe Stickstoffwerte. Um die Ursache dieser Erscheinung aufzuklären, wurden der Übersichtlichkeit wegen Präparate genau nach der Neumannschen Vorschrift — also mit vorgeschriebenem Wasserzusatz — hergestellt; die Flüssigkeiten wurden aber nicht eingedampft, sondern sofort mit Alkohol gefällt. Auch solche Präparate zeigten trotz wiederholten Umfällens noch intensive rote Biuretreaktion und enthielten zuviel Stickstoff. Zur Beurteilung der Analysenwerte weise ich darauf hin, daß das Molekulargewicht der Nucleinsäure noch nicht völlig feststeht, weil noch Unsicherheiten hinsichtlich des Wassergehaltes bestehen. Wohl aber wissen wir durch die Untersuchungen von H. Steudel, daß im Molekül auf je 4 Phosphor- 15 Stickstoffatome kommen, daß also das Verhältnis $N : P = 1,70$ sein muß. Dieser Wert betrug bei den abgekürzt dargestellten Präparaten nach 10 Minuten dauernder Einwirkung der Natronlauge 1,94, nach halbstündiger aber noch 1,87, und nach einstündiger Dauer noch 1,86. Versuche, durch noch längere Einwirkung der Natronlauge den letzten Rest der Eiweißderivate abzuspalten, sind fehlgeschlagen, weil nach einstündiger Dauer sehr bald auch eine Zersetzung der Nucleinsäure beginnt. In einem Falle wurde z. B. ein Verhältnis $N : P = 1,6$ gefunden, obgleich das Präparat noch schwache Biuretreaktion zeigte, ein sicherer Beweis stattgehabter Zersetzung. Solche eiweißhaltigen

Nucleinsäuren sind mit Essigsäure fällbar, und zwar um so vollkommener, je höher der Stickstoffgehalt ist, es ist aber ein großer Überschuß von Essigsäure notwendig. Der Niederschlag löst sich auf Zusatz von Natriumacetat trotz stark saurer Reaktion wieder auf.

Vergleicht man die Resultate dieses abgekürzten Verfahrens mit denjenigen, die nach strikter Befolgung der Neumannschen Vorschrift erhalten zu werden pflegen, so kommt man zu dem Schluß, daß dem Eindampfen auf dem Wasserbade keine nebensächliche, sondern eine prinzipielle Bedeutung zukommt, zumal da man die gleichen Mißerfolge erlebt, wenn man besonders vorsichtig sein will und die verflüssigten Drüsen bei niederer Temperatur im Vakuum einzuziehen versucht. Beim Erhitzen mit starker Natriumacetatlösung auf dem Wasserbade muß sich also die Abspaltung der letzten Eiweißreste vollziehen. Dies ist in der Tat der Fall; denn es war leicht möglich, sämtliche oben erwähnten biurethaltigen Präparate schon nach einmaligem Umfällen praktisch eiweißfrei zu bekommen, wenn sie zuvor einige Stunden im siedenden Wasserbade mit 20%iger Natriumacetatlösung erhitzt worden waren. Gegen Natriumacetat aber ist die Nucleinsäure in Siedehitze selbst während vieler Stunden beständig. Die Rolle, die das Natriumacetat spielt, ist also eine doppelte: Erstens vermag es eiweißhaltige Nucleinsäure, die sonst beim Ansäuern mit Essigsäure leicht ausfallen könnte, in Lösung zu halten; zweitens aber spaltet es beim stundenlangen Erhitzen während des Eindampfens den Rest der Eiweißderivate ab, wodurch die Erzielung biuretfreier Präparate erst ermöglicht wird.

Es ist nun interessant, daß Neumann, dem diese Verhältnisse offenbar nicht bekannt waren, rein empirisch gefunden hat, daß die Anwesenheit von viel Natriumacetat die Darstellung der Nucleinsäure günstig beeinflusse, er setzt ja auch Natriumacetat in reichlicher Menge von vornherein zu. Über die Rolle, die dieses Salz spielen soll, spricht Neumann sich nicht eindeutig aus, wenn er sagt: «Um die Reaktion besser regulieren zu können, empfiehlt sich der Zusatz von Salzen organischer Säuren, wie Natriumacetat, weil dadurch

die Reaktion noch weiter gemäßigt wird und bessere Ausbeuten erzielt werden.¹⁾

Der Schwerpunkt der Wirkung des Natriumacetats liegt aber nun zweifellos nicht in der Zeit der Einwirkung der Natronlauge, sondern während des späteren Eindampfens auf dem Wasserbade.

Man kann nun fragen, ist es tatsächlich die Wirkung des schwach alkalischen Natriumacetats, oder ist eine völlige Abspaltung der Eiweißderivate nicht auch mit bloßem Wasser möglich? Diese Frage ist jedoch praktisch unerheblich, weil auf die Gegenwart des Natriumacetats unter keinen Umständen verzichtet werden kann. Es besteht nämlich die Gefahr, daß bei der Spaltung freie Nucleinsäure entstehen könnte. Diese würde sich aber in der Hitze sofort zersetzen. In Gegenwart von Natriumacetat bildet sich jedoch das beständige Natriumsalz; denn es ist bekannt, daß die in Wasser unlösliche freie Nucleinsäure sich in Natriumacetat löst, und umgekehrt aus der Lösung ihres Natriumsalzes mit Essigsäure nicht wieder auszufällen ist.

Da also bei der Darstellung der Nucleinsäure dem Erhitzen mit Natriumacetat eine so große Bedeutung zukommt, ist es natürlich empfehlenswert, dieses besonders, etwa nach der ersten Rohfällung vorzunehmen und nicht den Zufälligkeiten während des Eindampfens zu überlassen; sind doch Temperatur und Dauer bei dieser Operation zu sehr abhängig von der Größe des Wasserbades und der Schale, von der Leistungsfähigkeit des Brenners und vor allem von der Menge des einzudampfenden Materials, zumal ein Einengen nach der geschilderten abgekürzten Methode überhaupt in Fortfall kommen kann.

Was die Technik des abgekürzten Verfahrens anbetrifft, so machte die Abscheidung der Alkalialbuminate nach der Neutralisation mit Essigsäure einige Schwierigkeiten, weil wegen der großen Konzentration der verflüssigten Drüsen jene leicht Emulsionen mit dem vorhandenen Fett bilden. Ich habe schon früher darauf hingewiesen,²⁾ daß man Niederschläge, die leicht

¹⁾ Archiv f. Physiologie, 1899, Suppl., S. 554.

²⁾ R. Feulgen, Dissertation, Kiel 1912.

kolloidal suspendiert bleiben, dann in gut filtrierbarer Form erhält, wenn man die Fällung in Siedehitze in Gegenwart von viel Talkum vornimmt. Die Methode führte auch in diesem Falle zu stets guten Resultaten.

Bei der jetzt zu beschreibenden Methode wurde vor allem Gewicht auf eine schnelle Ausführbarkeit aller Operationen, besonders des Filtrierens gelegt. Ferner mußte der hohe Schmelzpunkt der sehr festen Gallerte (über 70°) bei allen Manipulationen berücksichtigt werden. Bei Befolgung der angegebenen Punkte ist es möglich, selbst große Mengen Nucleinsäure in einem, höchstens zwei Tagen herzustellen, wozu sonst eine Woche erforderlich war.

Darstellung des nucleinsauren Natriums.

In einem emaillierten Kessel bringt man 10 Liter gewöhnliches Wasser zum Sieden, gibt 10 ccm Eisessig hinzu und trägt 3 kg reinpräparierte und in handtellergröße Stücke zerschnittene Thymusdrüsen vom Kalbe ein. Man läßt das heiße Wasser 20 Minuten einwirken und sorgt durch Anwendung eines großen Brenners dafür, daß das Wasser nach dem Einbringen der Drüsen bald wieder ins Kochen kommt. Nach Ablauf der Zeit gießt man das kochende Wasser ab, breitet die Drüsen auf einem Tuche aus und hackt sie in einer Fleischhackmaschine in einen tarierten etwa 6 l fassenden Kochtopf hinein. Man bringt nun das Gewicht der Drüsensubstanz mit Wasser wieder auf 3 kg und verrührt die Masse zu einem gleichmäßigen Brei. Mit dem Wasserzusatz gehe man unter stetem Umrühren sehr allmählich vor, es werden so mit Sicherheit Knoten vermieden. Jetzt gibt man 300 g Natriumacetat hinzu, setzt den Topf in ein lebhaft siedendes Wasserbad (wozu event. ein größerer Kessel dienen kann) zugedeckt mit einer mit kaltem Wasser gefüllten Abdampfschale, welche als Rückflußkühler wirkt, und bringt so dessen Inhalt unter gelegentlichem Umrühren mit einem kräftigen Holzseit auf eine Temperatur von 80° (Dauer ca. 1/2 Std.).

Wenn diese Temperatur erreicht ist, gibt man unter Umrühren 150 ccm 33%ige Natronlauge (D. A. B. V.) hinzu.

Die Masse wird im ersten Augenblicke sehr zähflüssig, in wenigen Minuten jedoch wieder dünnflüssig, und im Laufe der ersten 10 Minuten tritt vollkommene Verflüssigung ein. Wenn dies erreicht ist, ist ein Umrühren nicht mehr erforderlich. Nach $\frac{1}{2}$ Std. vom Einbringen der Natronlauge an gerechnet, rührt man 75 g Talkum in die Flüssigkeit hinein und neutralisiert im Wasserbade mit 50%iger Essigsäure, bis die Reaktion eben nicht mehr alkalisch ist; die Masse reagiert dann, da eine breite Zone amphoterer Reaktion durchlaufen wird, schon deutlich sauer. (Erforderlich ca. 200 ccm). Man setzt jetzt den Kessel auf eine Asbestplatte über einen großen Brenner und erhitzt unter Umrühren bis zum Sieden. In diesem Stadium fügt man 50 ccm Amylalkohol (iso) hinzu, worauf der Schaum sofort verschwindet, der sonst ein Absetzen der Eiweißderivate unmöglich machen würde. Man kocht sodann einmal auf, setzt den Topf zum Absetzen in das siedende Wasserbad zurück, gießt nach Verlauf einer Viertelstunde die überstehende fast klare Flüssigkeit in einen 10 l fassenden Kochkessel und koliert den Rest durch ein im Heißwassertrichter liegendes Koliertuch in die Hauptmenge hinein. Der Rückstand wird mit $\frac{1}{2}$ l Wasser ausgekocht und abermals koliert. Die inzwischen zu einer festen Gallerte erstarrte Kolatur wird im siedenden Wasserbade oder auch auf der Asbestplatte über freier Flamme bis auf 80° erwärmt und im Kochtopfe mit 5 l siedendem Alkohol unter Umrühren versetzt. Es entsteht sofort ein schöner schneeweißer Niederschlag von noch eiweißhaltigem nucleinsaurem Natrium, der Neigung hat, sich in wenigen Augenblicken zu Boden zu setzen. Man gießt Flüssigkeit samt Niederschlag in einen angewärmten Glaszylinder, läßt $\frac{1}{2}$ Std. absitzen, hebert die überstehende fast klare schwach braun gefärbte Mutterlauge ab, wirbelt den Niederschlag durch Umschwenken auf und saugt ihn über einem doppelten weichen Filter ab unter Zuhilfenahme eines Waschalkohols, bestehend aus 300 ccm Wasser, 600 ccm Alkohol und 20 ccm konz. Natriumacetatlösung. Gegen Schluß des Absaugens drücke man die Masse mit einem Pistill fest zusammen, zerschneide den entstandenen

etwas elastischen Kuchen samt Filter mittels eines mit dem Waschalkohol befeuchteten Messers in Streifen und bringe diese in einen 2 l fassenden trockenen Kolben. Wird er jetzt kräftig geschüttelt, so zerfallen die Streifen zu einer bröckligen Masse, die mit 1 l Wasser übergossen und im Wasserbade gelöst wird. Zu der Lösung fügt man 200 g Natriumacetat (D. A. B. V.), sowie wegen des noch vorhandenen Alkohols einige Siedesteinchen hinzu und stellt den Kolben mit einem Steigrohr versehen auf 4 Std. in das lebhaft siedende Wasserbad. Nach Ablauf dieser Zeit filtriert man durch ein Faltenfilter im Heißwassertrichter wie oben in den Kochtopf hinein, kocht das Filter mit 300 ccm Wasser aus, dessen Filtrat mit der Hauptmenge vereinigt wird, verflüssigt den inzwischen erstarrten Inhalt des Kessels wieder und fällt mit 2 $\frac{1}{2}$ l warmem Alkohol. Die ersten Anteile muß man vorsichtig in kleinen Portionen zusetzen, der entstehende Niederschlag löst sich dann bis zu einem bestimmten Punkte immer wieder auf; erst wenn er Neigung hat, bestehen zu bleiben, fügt man den Rest schnell hinzu. Das nucleinsaure Natrium fällt teils flockig, teils als weiche Masse aus. Der Charakter der Fällung ist von mehreren Faktoren abhängig; je länger man das Präparat mit Natronlauge oder in wässriger Lösung besonders mit Natriumacetat erhitzt hat, um so größer ist die Neigung, nicht flockig, sondern als teigige Masse, ja unter Umständen sogar schmierig (nach sehr langem Eindampfen) auszufallen. In Siedehitze niedergeschlagen, fällt das reine nucleinsaure Natrium immer sehr weich aus, im Gegensatz zu der ersten eiweißhaltigen Rohfällung, die am schönsten in Siedehitze zu erhalten ist. Überhaupt habe ich den bestimmten Eindruck, daß das Präparat um so schöner flockig ausfällt, je unreiner es noch ist; auch nach der ungekürzten Neumannschen Methode dargestellt, fällt die erste Rohfällung, wenn nicht allzu lange eingedampft worden war, fast stets schön flockig; die späteren Umfällungen sind dagegen stets teigig.

Die Weiterverarbeitung des Präparates geschieht nun derart, daß man die Masse nach halbstündigem Absitzen über einem Filter absaugt, auspreßt, den Rückstand in Streifen schneidet

und diese in der gleichen Weise wie vorher in 1 l Wasser löst. Stellt man den Kolben jetzt auf etwa eine Viertelstunde in das siedende Wasserbad, so scheidet sich noch ein geringer flockiger Niederschlag ab, der im Heißwassertrichter filtriert wird. Das Filtrat wird mit 10 g Natriumacetat versetzt und in der gleichen Weise wieder mit 2 l Alkohol gefällt, die Fällung dieses Mal über einem gehärteten Filter abgesaugt, der Rückstand zerzupft und über Nacht unter absolutem Alkohol stehen gelassen. Man vermeide aber, das Präparat zu sehr zu drücken, sonst geht die vorhandene Porosität verloren, und der Körper wird im Alkohol nur langsam und unter Entstehung sehr harter Brocken entwässert. Am anderen Morgen gießt man den Alkohol ab und verreibt das Produkt unter Alkohol in der Reibschale; endlich wird der entstandene weiße Schlamm über einem gehärteten Filter abgesaugt, mit Äther nachgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure vollends getrocknet. Ausbeute ca. 100 g.

Das so dargestellte nucleinsäure Natrium ist biuretfrei, löst sich in Wasser klar und farblos auf und gibt das verlangte Verhältnis $N : P = 1,70$.

Präparat I.

0,1954 g sättigten 17,5 ccm n_{10} -Säure; $N = 12,54\%$ (Kjeldahl)
 0,0988 „ „ 13,0 „ $n_{1/2}$ -Lauge; $P = 7,30\%$ (Neumann)
 $N : P = 1,72$ (ber. 1,70).

Präparat II.

0,2175 g sättigten 20,1 ccm n_{10} -Säure; $N = 12,94\%$ (Kjeldahl)
 0,1093 „ „ 14,8 „ $n_{1/2}$ -Lauge; $P = 7,51\%$ (Neumann)
 0,1125 „ „ 15,2 „ „ ; $P = 7,49\%$ „
 $N : P = 1,72$ (ber. 1,70).

0,2867 Substanz : 0,3184 CO_2 ; $C = 30,3\%$. $C : P = 4,04$ (ber. 4,15).

Zur weiteren Charakterisierung der a-Nucleinsäure empfehle ich den Schmelzpunkt einer gelatinierten 5%igen Lösung des Natriumsalzes. Dieser gibt uns nämlich Aufschluß über die Menge der nebenbei gebildeten b-Säure, deren Natriumsalz in 5%iger Lösung nicht gelatiniert und daher den Fp. herabsetzt. Der Schmelzpunkt liegt demnach um so tiefer, je mehr von der b-Säure sich gebildet hat — also je länger das Präparat der Einwirkung der Natronlauge oder auch des Natriumacetats

(letzteres viel milder wirkend) in Siedehitze ausgesetzt war. Die nach dem beschriebenen abgekürzten Verfahren hergestellten Präparate weisen, wegen des Fortfallens des Eindampfens, Schmelzpunkte auf, wie sie nach der alten Methode nicht erreicht werden konnten.

Der Schmelzpunkt einer 5%igen Gallerte lag bei den analysierten Präparaten bei 50° bzw. 54°. Die Gegenwart von Natriumacetat setzt die Schmelzpunkte erheblich herauf; so betrug der Schmelzpunkt von Präparat II

in Wasser (zu 5% gelöst)	54°
in 1%iger Natriumacetatlösung	63°
in 10%iger "	71°

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln aus der «Gräfin-Bose-Stiftung» angestellt.
