

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM
KARLSRUHE**

August 1965 / Juli 1966

KFK 476

Institut für Strahlenbiologie

Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von T_1 -Bakteriophagen

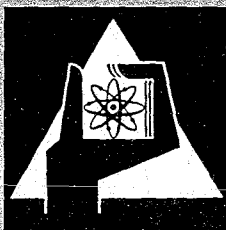
K. - O. Hermann

Kinetische Untersuchungen zur Gamma-Radiolyse von 5-Bromuracil
in wäßriger Lösung

H. Reuschl

Optische Analyse der Sedimentation in der präparativen Ultrazentrifuge

W. Günther, T. Mohr, G. Hotz, A. Müller



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.

KARLSRUHE



Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von T₁-Bakteriophagen

KLAUS-OTTO HERMANN

Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von T₁-Bakteriophagen

KLAUS-OTTO HERMANN

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 21 b, 678—682 [1966]; eingegangen am 8. März 1966)

The radiosensitivity of dry bacteriophage was determined in vacuo at temperatures varying continuously between 100 ° and 300 °K using 2 MeV protons. Moreover, the influence of added cystamine and of base substitution by 5-bromouracil was investigated in the same range of temperatures. The variation of total cross section $\sigma(T)$ with temperature is given by the expression:
$$\sigma(T) = \sigma_0 \cdot (1 + 5,3 \cdot e^{-E_a/RT}) \pm 15 \text{ per cent.}$$

The constant σ_0 is $3,3 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ for normal T₁ phage, $4,9 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ for base substituted T₁ phage, $1,3 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ for T₁ phage in presence of cystamine, and $1,6 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ for base substituted T₁ phage in presence of cystamine; E_a amounts to 1 kcal/mole in all four cases. The correlation between inactivation cross section σ and temperature T shows that two mechanisms of inactivation are present, one (σ_0) being independent of temperature, the other having an activation energy of about 1 kcal/mole. The first mechanism is ascribed to direct radiation action, while the temperature dependent component probably originates from small diffusible radicals.

Die Erkenntnis der zentralen Bedeutung der Nucleinsäuren für die gesamte Biologie führte zu einer in den letzten Jahren zunehmenden Zahl von Arbeiten über die Wirkung ionisierender Strahlung auf Nucleinsäuren, besonders auf DNS. Speziell bei Messungen an Bakteriophagen stellte man wiederholt fest, daß die Strahlenempfindlichkeit der DNS in starkem Maße von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur und der Konzentration der anwesenden Schutzstoffe abhängig ist. Durch genauere Untersuchungen des Temperatureinflusses sollte es möglich sein, die physikalischen und chemischen Mechanismen der biologischen Strahlenwirkung aufzuklären und dadurch auch neue Hinweise auf die Art der DNS-Schädigung zu gewinnen.

1. Experimenteller Teil

1.1. Versuchsobjekt: Die Verwendung von T₁-Bakteriophagen als Untersuchungsobjekt hat folgende Gründe: T₁-Phagen bestehen etwa zur Hälfte aus DNS, die Strahlenwirkung kann an ihnen ohne Störung durch physiologische Vorgänge untersucht werden, die Ergebnisse sind statistisch leicht zu sichern, die erhaltenen Dosis-Effekt-Beziehungen sind bei ionisieren-

der Strahlung meist Eintrefferkurven und außerdem wird die Aktivität der Viren durch extreme Umweltsbedingungen kaum beeinträchtigt.

1.2. Probenherstellung: Es wurden jeweils 0,01 ml Phagensuspension in Nährbouillon auf Feingoldronden (ϕ 12 mm) aufgebracht und eingetrocknet. Durch das Trocknen verlieren zwischen 50–90% der Viren ihre Aktivität. Wird die Bouillonkonzentration von 0,8 auf 4% erhöht, so steigt der Prozentsatz der Überlebenden stark an. Bei Messungen mit Cystaminzusatz wurden deshalb die Phagen in 4% Difco Nährbouillon suspendiert, da eine niedrige Restaktivität die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigt.

1.3. Herkunft und Herstellung der Phagen: Der untersuchte T₁-Coliphage und seine Wirtszellen rührten von Stämmen her, die uns 1958 vom Institut für Genetik der Universität Köln zur Verfügung gestellt und in unserem Institut in Passagen weitergeführt worden waren. Kulturen der Bakterienstämme wurden, ebenso wie die Lysate, nach der üblichen Methode in Difco-Nährbouillon angesetzt. Bei den Versuchen mit Schutzstoff wurde die Verdünnung der Stammsuspension in Nährbouillon durchgeführt, die außerdem 0,1 Mol/l Cystamin enthält. Nach einer von STAHL¹ angegebenen Methode wurde bei einem Teil der Phagen 5-Bromuracil anstelle von Thymin in die Phagen-DNS eingebaut. Der Einbau des Bromuracils hat eine wesentliche Steigerung der Strahlenempfindlichkeit zur Folge, die vom Prozentsatz des ersetzten Thymins ab-

hängt. UV-Bestrahlungen an den von uns verwendeten T1-BUDR-Phagen zeigten, daß etwa 65% des normalerweise vorhandenen Thymins durch Bromuracil ersetzt worden war.

1.4. Bestrahlungseinrichtung: Die Bestrahlungen wurden mit 2-MeV-Protonen eines Van de Graaff-Beschleunigers durchgeführt. Der Protonenstrahl wurde durch einen Analysiermagneten gereinigt und durch zwei Nickelfolien derartig aufgefächert, daß eine homogene Probenausleuchtung erzielt wurde. Den Aufbau der verwendeten Bestrahlungskammer zeigt Abb. 1. Der

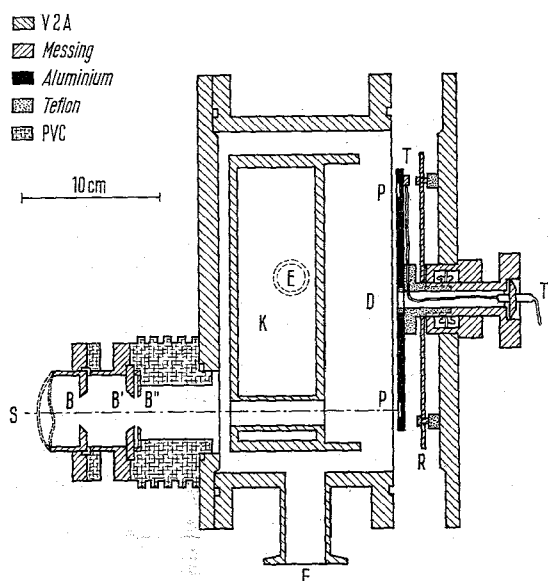


Abb. 1. Bestrahlungskammer. B = Eintrittsblenden, D = Probenhalter, E = Kühlmitteleinlaß, F = Absaugstutzen, K = Kühlfalle, P = Proben, R = Abdeckplatte, S = Strahlachse, T = Thermoelement.

von außen drehbare Probenhalter (D) bestand aus einer schwarzen Aluminiumscheibe mit 19 Probenpositionen. In der Kammer befand sich eine Kühlfalle (K), die es erlaubte, Bestrahlungen bei Temperaturen bis zu 100 °K durchzuführen. Die Kühlfalle war so konstruiert, daß der Probenhalter — bis auf die Öffnung für den Protonenstrahl — ringsum von gekühlten, schwarzen Flächen umgeben war. Bei Verwendung von flüssigem Stickstoff als Kühlmittel erreichte man innerhalb von drei Std. eine Abkühlung bis auf 100 °K, da sich infolge der Wärmestrahlung die Proben-temperatur der Kühlmitteltemperatur annäherte. Weil die Bestrahlungszeiten kurz gegen die Abkühlzeiten der Proben waren, konnte bei jeder beliebigen Zwischentemperatur bestrahlt werden.

1.5. Temperaturmessung: Da biologische Objekte sehr schlechte Wärmeleiter sind, stellt sich im Vakuum das Temperaturgleichgewicht überwiegend durch Wärmestrahlung ein. Die Temperatur des Probenhalters wurde mit einem Thermoelement gemessen, das vor jeder Bestrahlung geeicht wurde. Die Erwärmung der Proben durch die Bestrahlung berechnet sich bei einer Dosis von 1 Mrad zu 2,4 °K (bei Zimmertemperatur) und liegt daher innerhalb der Meßfehlergrenzen. Aufheizung der Proben durch den Protonenstrahl müßte zu einem experimentell nicht gefundenen Steilerwerden der Dosis-effekt-kurven bei höheren Dosen und Dosisleistungen führen, vorausgesetzt, daß sich das Temperaturgleichgewicht nicht in so kurzer Zeit einstellt, daß diese Erwärmung noch zu den primären Energieabsorptions-Prozessen gezählt werden muß.

1.6. Bestrahlungen: Die Proben wurden zunächst einen Tag lang im Exsikkator und anschließend weitere 15 Std. lang in der Bestrahlungskammer bei 10⁻⁵ Torr getrocknet, ehe sie auf die gewünschte Bestrahlungstemperatur gebracht wurden. Zur Dosimetrie der 2-MeV-Protonen wurde die Kammer als Faraday-Käfig ausgebildet, und die in die Kammer gelangende Ladungsmenge mittels eines Integrators gemessen. War die vorgewählte Ladung erreicht, betätigte der Integrator einen Verschuß, der den Protonenstrahl unterbrach. Nach der Bestrahlung wurden die Proben durch Entfernung des Kühlmittels wieder auf Zimmertemperatur gebracht.

1.7. Titration der Phagen: Nach der Bestrahlung wurden die Phagen in einem Reagenzglas mit 5 ml 1-proz. Trypton-Nährbouillon quantitativ von ihrer Unterlage abgelöst und ihre Konzentration nach konventionellen Methoden² bestimmt.

2. Ergebnisse

Inaktivierungsversuche an Bakteriophagen mit ionisierender Strahlung liefern unter den meisten Versuchsbedingungen Eintrefferkurven, die sich durch die Beziehung

$$N/N_0 = \exp(-D/D_{37}) = \exp(-\sigma \cdot D) \quad (1)$$

beschreiben lassen. Dabei bedeutet N die Zahl der aktiven Phagen bei der Strahlendosis D , N_0 die Zahl der ursprünglich (bei $D=0$) vorhandenen Phagen, D_{37} die Dosis, bei der die Zahl der aktiven Phagen auf den e -ten Teil der ursprünglich vorhandenen abgenommen hat, und $\sigma = 1/D_{37}$ ist der hierdurch definierte Inaktivierungs-Querschnitt. Diese Form der Dosis-Effekt-Beziehung bei T1-Bakterio-

¹ F. W. STAHL, J. M. CRASEMANN, L. OKUN, E. FOX, and C. LAIRD, *Virology* 13, 98 [1961].

² M. H. ADAMS, *Bacteriophages*, Interscience Publish Inc., New York 1959.

phagen ist wiederholt³⁻¹² und mit verschiedenen ionisierenden Strahlenarten gemessen worden. Auch unsere Messungen an normalen T1-Phagen und T1-BUDR-Phagen ergaben sowohl mit als auch ohne Cystaminzusatz gut reproduzierbare Eintrefferkurven, von denen zwei als typische Beispiele in Abb. 2 aufgetragen sind. In der Tabelle sind die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelten Inaktivierungs-Querschnitte zusammengestellt. Um die Abhängigkeit der Inaktivierungs-Querschnitte von der Bestrahlungstemperatur genauer zu untersuchen, wurden die Proben mit jeweils der gleichen Dosis bestrahlt, wobei die Temperatur von Probe zu Probe in kontrollierter Weise verändert wurde. Aus dem Inaktivierungsgrad N/N_0 läßt sich nach Gl. (1) der Inaktivierungs-Querschnitt σ ermitteln. Zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit von Inaktivierungs-Querschnitten wird in letzter Zeit öfter der Ansatz $\sigma = \text{const} \cdot \exp(-E_a/RT)$ verwandt^{13, 14}, wobei R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur bedeuten; E_a ist die Summe der Aktivierungsenergien der zur Inaktivierung der Phagen führenden chemischen Reaktionen. Der Wert von E_a läßt sich bei logarithmischer Auftragung von σ über der reziproken Temperatur aus der Steigung auftretender Geraden unmittelbar bestimmen. Die Kurven I und II in Abb. 3 geben eine solche Darstellung der

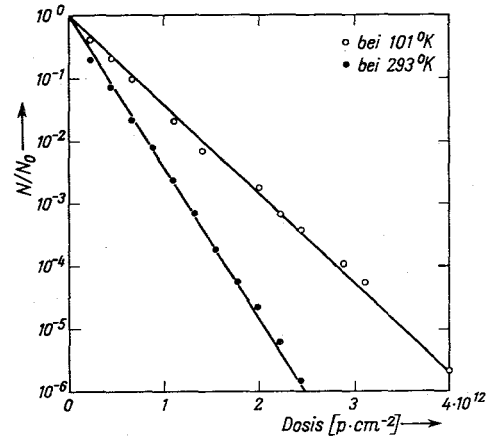


Abb. 2. Inaktivierung von T1-Bakteriophagen durch 2-MeV-Protonen bei 101° und 293 °K.

an T1-Bakteriophagen gemessenen Inaktivierungs-Querschnitte wieder. Da die Kurven nicht linear sind, bedeutet dies, daß wahrscheinlich mehrere Prozesse mit unterschiedlicher Aktivierungsenergie wirksam sind. Nach Abzug eines temperatur-unabhängigen Anteils mit einer Aktivierungsenergie $E_a = 0$ (unterbrochene Geraden in Abb. 3) ergeben sich eindeutig Arrhenius-Geraden (Kurven I_a und II_a in Abb. 3), deren Steigung einer Aktivierungsenergie von 1 kcal/Mol entspricht. Bei den Ver-

Material	Temperatur [°K]	Wirkungsquerschnitt [10 ⁻¹² cm ²]	Inaktivierungsdosis D_{37}		Fehlergrenzen [%]
			[p _{cm} ⁻² · 10 ¹¹]	[krad]	
T1	293	5,41	1,85	494	± 11
T1	101	3,16	3,17	845	± 20
T1 + Cy	293	2,44	4,09	1079	± 14
T1 + Cy	117	1,76	5,67	1513	± 9
T1 - BUDR	293	8,40	1,19	316	± 12
T1 - BUDR	104	4,74	2,11	559	± 5
T1 - BUDR + Cy	293	4,10	2,44	650	± 12
T1 - BUDR + Cy	129	2,00	5,00	1335	± 6

Tab. I. Wirkungsquerschnitt σ und D_{37} für die Inaktivierung von T1-Bakteriophagen mit 2-MeV-Protonen. Die angegebenen Werte wurden aus der Steigung der Ausgleichgeraden durch die Meßpunkte bestimmt. Dabei wurden die Werte der ersten Dekade ($N/N_0 > 0,1$) wegen ihrer offensichtlichen Ungenauigkeit verworfen. Die angegebenen Fehlergrenzen sind die mit dem sog. t -Faktor für 5% multiplizierten Standardabweichungen dieser Regressionsanalysen.

³ W. R. ADAMS and E. POLLARD, Arch. Biochem. Biophysics 36, 311 [1952].

⁴ C. S. BACHOFER, C. F. EHRET, S. MAYER, and E. L. POWERS, Bacteriology 36, 744 [1953].

⁵ T. BRUSTAD, Rad. Res. 15, 139 [1961].

⁶ M. DAVIS, Arch. Biochem. Biophysics 49, 417 [1954].

⁷ D. J. FLUKE, T. BRUSTAD, and A. BIRGE, Rad. Res. 13, 788 [1960].

⁸ D. J. FLUKE and F. FORRO, Rad. Res. 13, 305 [1960].

⁹ G. HOTZ and K. G. ZIMMER, Int. J. Rad. Biology 7, 75 [1963].

¹⁰ PH. SCHAMBRA and F. HUTCHINSON, Rad. Res. 23, 514 [1964].

¹¹ G. HOTZ, Habilitationsschrift, Technische Hochschule Karlsruhe (1965).

¹² G. HOTZ, Z. Naturforsch. 17b, 37 [1962].

¹³ L. G. AUGENSTEIN, Advances in Enzymol. 24, 360 [1962].

¹⁴ L. G. AUGENSTEIN, T. BRUSTAD, and R. MASON, Advances in Rad. Biol. 1, 228 [1964].

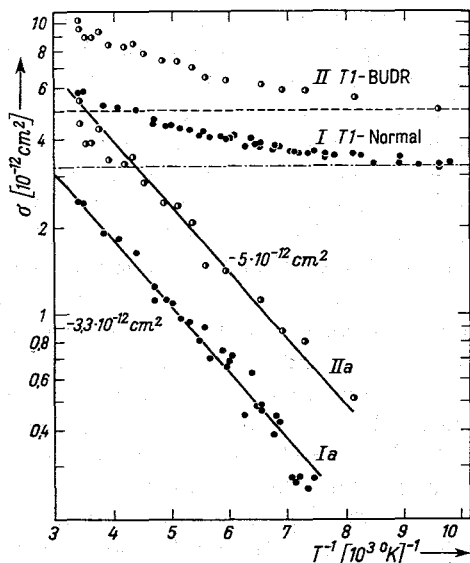


Abb. 3. Verlauf des Inaktivierungs-Querschnitts von T₁-Bakteriophagen mit der Temperatur, gemessen mit 2-MeV-Protonen. I bei normalen T₁-Phagen, Ia nach Abzug eines konstanten Anteils σ_0 (T₁), II bei schweren T₁-BUDR-Phagen, IIa nach Abzug eines konstanten Anteils σ_0 (T₁-BUDR).

suchen mit Cystamin zeigen die gemessenen Inaktivierungs-Querschnitte das gleiche Verhalten; auch hier findet man zwei Komponenten, von denen die eine Temperatur-unabhängig ist ($E_a = 0$), während die andere eine Aktivierungsenergie von 1 kcal/Mol besitzt. Die Abhängigkeit der unter verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelten Inaktivierungs-Querschnitte $\sigma(T)$ von der Temperatur läßt sich durch folgende Ausdrücke beschreiben:

$$\left. \begin{aligned} \sigma_1 &= 3,3 \cdot (1 + 4,2 \cdot e^{-E_a/RT}) \\ \sigma_2 &= 4,9 \cdot (1 + 5,3 \cdot e^{-E_a/RT}) \\ \sigma_3 &= 1,3 \cdot (1 + 5,8 \cdot e^{-E_a/RT}) \\ \sigma_4 &= 1,6 \cdot (1 + 5,9 \cdot e^{-E_a/RT}) \end{aligned} \right\} \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2 \quad (2)$$

mit $E_a = 1$ kcal/Mol.

σ_1 gilt für normale T₁-Phagen, σ_2 für T₁-BUDR-Phagen, σ_3 für normale T₁-Phagen mit Cystaminzusatz und σ_4 für T₁-BUDR-Phagen mit Cystaminzusatz. Bemerkenswert ist, daß die Klammerausdrücke, die den Einfluß der Temperatur wiedergeben, in allen vier Gleichungen innerhalb der Fehlergrenzen etwa gleich sind. Der Schutzeffekt durch Cystamin ist bei normalen wie bei Basen-substituierten T₁-Phagen gleich; das zeigt sich darin, daß die Verhältnisse σ_1/σ_3 und σ_2/σ_4 in beiden Fäl-

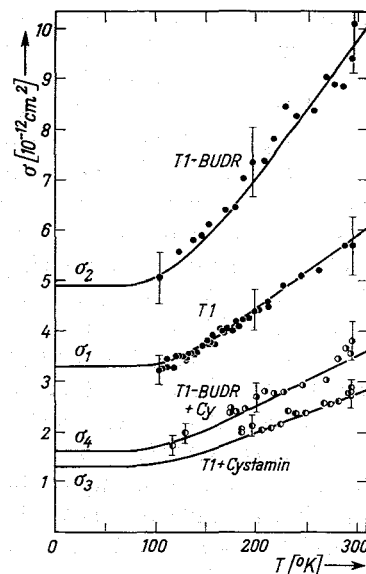


Abb. 4. Verlauf des Inaktivierungs-Querschnitts für T₁-Bakteriophagen mit der Temperatur, gemessen mit 2-MeV-Protonen. Die durchgezogenen Kurven geben den Verlauf nach Gl. (2) wieder.

len etwa 2,5 betragen. Die bei verschiedenen Temperaturen gemessenen Wirkungsquerschnitte sind in Abb. 4 über der Temperatur aufgetragen, wobei die durch die Meßpunkte gelegten Kurven Gl. (2) entsprechen. Die Abb. 4 zeigt, wie genau im Temperaturintervall zwischen 100 und 300 °K der Verlauf des Wirkungsquerschnitts durch Gl. (2) beschrieben wird.

3. Diskussion

Die als Versuchsergebnis gewonnenen Gln. (2) zeigen, daß sich die beobachtete biologische Wirkung der Protonen aus zwei Komponenten zusammensetzt, von denen eine nicht von der Bestrahlungstemperatur, sondern nur von der Basenzusammensetzung und der Cystaminzugabe abhängt, während die andere durch die Temperatur zu beeinflussen ist. Bemerkenswert ist, daß die Temperaturabhängigkeit in allen vier Fällen (σ_1 , σ_2 , σ_3 , σ_4) durch Ausdrücke mit einer einheitlichen Aktivierungsenergie beschrieben wird. Auch bei Inaktivierungsversuchen an anderen biologischen Objekten, bei denen der Temperatureinfluß untersucht wurde, fand man Aktivierungsenergien dieser Größe. Aus-

fürliche Messungen an Bakteriensporen¹⁵⁻¹⁷ zeigten, daß der Inaktivierungs-Querschnitt zwischen 5 und 80 °K praktisch konstant verläuft ($E_a = 0$) und nach höheren Temperaturen hin wie bei den vorliegenden Messungen ansteigt. Unser Auswertungsverfahren ergibt auch hier¹⁵ eine Aktivierungsenergie von etwa 1 kcal/Mol. An Enzymen sind Messungen des Temperaturverlaufs von Inaktivierungs-Querschnitten häufig durchgeführt worden. BRUSTAD¹⁸ hat die Inaktivierung von Trypsin mit schweren Ionen, FLUKE¹⁹ die Inaktivierung von Ribonuclease und Lysozym mit 3-MeV-Elektronen gemessen. Die Inaktivierung von Ribonuclease mit 2-MeV-Protonen und Deuteronen wurde außerdem von GÜNTHER²⁰ untersucht. HENRIKSEN²¹ hat die mit der Temperatur zunehmende Radikalausbeute in Ribonuclease, Trypsin und Lysozym bei Bestrahlung mit Elektronen und schweren Ionen gemessen. In allen Fällen wurde ein konstanter ($E_a = 0$) und ein Temperatur-abhängiger Anteil mit einer Aktivierungsenergie von etwa 1 kcal/Mol ($\pm 40\%$) ermittelt.

Die Experimente werden durch die folgende Hypothese gedeutet: Wenn außer der Ionisierungsenergie genügend Energie in Form thermischer Anregung auf ein Molekül übertragen wird, kann es nach PLATZMAN²² zu einer Dissoziation des getroffenen Moleküls in zwei Molekülfragmente kommen. Unter Umständen führt dieser primäre Prozeß schon zu einer beobachtbaren biologischen Wirkung. Der dadurch bewirkte Anteil des Inaktivierungs-Querschnitts ist unabhängig von der Bestrahlungstemperatur, da Ionisationen und Molekülanregungen Temperatur-unabhängig sind. Viele Dissoziationen, bei denen sich kleine Radikale, zumeist wahrscheinlich Wasserstoffatome²³, bilden, sind aber zunächst biologisch irrelevant. Die kurz nach ihrer Entstehung im thermischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung stehenden Wasserstoffradikale können verschwinden, indem sie mit anderen rekombinieren, ein neues Radikal durch Reaktion mit einem unbeschädigten Nucleotid bilden oder ohne Reaktion entweichen. Wasserstoffradikale können aber nach einer Hypo-

these von BRAAMS²⁴ den Temperatur-abhängigen Anteil des Inaktivierungs-Querschnitts bewirken, da sie im Festkörper selbst bei tiefen Temperaturen diffundieren. Je nach Temperatur treten die schädigenden oder die harmlosen Reaktionen in den Vordergrund. Bei tiefen Temperaturen überwiegt wegen der geringen Energie der Wasserstoffradikale die Rekombination und das Entweichen, so daß wir nur die primären Effekte bemerken. Damit die Radikale aber eine Austausch- oder Anlagerungsreaktion durchführen können, ist ein Mindestmaß thermischer Energie, die Aktivierungsenergie, erforderlich, die für Radikalreaktionen nicht besonders groß ist. So gehen z.B. die exothermen Anlagerungsreaktionen des Wasserstoffatoms an Olefine oder andere Verbindungen mit Mehrfachbindungen (selbst bei 80 °K) mit Aktivierungsenergien zwischen 1 bis 4 kcal/Mol vor sich²⁵. Mit zunehmender Temperatur wächst die Zahl der Radikale ausreichender Energie exponentiell an, weshalb wir für den Inaktivierungs-Querschnitt Ausdrücke wie Gl. (2) erhalten.

Da durch Cystaminzugabe sowohl der Temperatur-abhängige als auch der Temperatur-unabhängige Anteil um den gleichen Faktor von etwa 0,4 abnehmen, wird offenbar durch das Cystamin die Zahl der primären Dissoziationen herabgesetzt, wodurch die Zahl der diffusiblen Radikale im gleichen Maße verringert wird.

Auf Grund unserer Experimente konnte eine Aussage über die physikalischen und chemischen Prozesse, die für die Schutzwirkung des Cystamins und den beobachteten Temperatureffekt verantwortlich sind, gemacht werden. Unsere Interpretation liefert zwanglos eine Erklärung dafür, daß der Verlauf der Inaktivierungs-Querschnitte mit der Temperatur von der Art der untersuchten biologischen Objekte weitgehend unabhängig ist.

Herrn Prof. K. G. ZIMMER danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und sein stets förderndes Interesse, den Herren Priv. Doz. Dr. G. HOTZ, Dr. H. JUNG und Priv. Doz. Dr. A. MÜLLER für Unterstützung bei der mikrobiologischen Technik und nützliche Ratschläge. Herrn P. KINDERMANN bin ich für seine Hilfe bei den Bestrahlungen zu großem Dank verpflichtet.

¹⁵ R. B. WEBB, C. F. EHRET, and E. L. POWERS, *Experientia* [Basel] 14, 324 [1958].

¹⁶ E. L. POWERS, R. B. WEBB, and C. F. EHRET, in: *Progress in Nuclear Energy, Series VI, Vol. 2* (eds. BUGHER, COURAGET, and LOUITT), Pergamon Press, New York 1959, p. 189.

¹⁷ E. L. POWERS, B. F. KALETA, and R. B. WEBB, *Rad. Res.* 11, 461 [1959].

¹⁸ T. BRUSTAD, in: *The Biological Effects of Neutron Irradiations*, Intern. Atomic Energy Agency, Wien 1964.

¹⁹ D. J. FLUKE, *Rad. Res.* 25, 18 [1965].

²⁰ W. GÜNTHER, Dissertation, Heidelberg 1965.

²¹ T. HENRIKSEN, University of California Radiation Laboratory Report, UCRL-16358 (1965).

²² R. L. PLATZMAN, in: *Radiation Biology and Medicine* (ed. W. D. CLAUS), Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass. 1958.

²³ K. G. ZIMMER, *Rad. Res. Suppl.* 1, 519 [1959].

²⁴ R. R. BRAAMS, *Nature* [London] 200, 752 [1963].

²⁵ N. N. SEMJONOW, *Einige Probleme der chemischen Kinetik und Reaktionsfähigkeit*, Akademie Verlag, Berlin 1961.

Kinetische Untersuchungen zur Gamma-Radiolyse von 5-Bromuracil in wäßriger Lösung

H. REUSCHL

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 21 b, 643–646 [1966]; eingegangen am 10. März 1966)

Es wurde die Kinetik des Abbaus von 5-Bromuracil in wäßriger Lösung bei $p_{\text{H}}=6,5$ durch Bestrahlung mit γ -Strahlen unter N_2 , O_2 und N_2O untersucht. Die Ergebnisse werden an Hand der Radikaltheorie wäßriger Lösungen diskutiert und eine Hypothese zur Ursache der Strahlensensibilisierung lebender Zellen durch Bromuracil abgeleitet.

Nach dem Einbau von 5-Bromuracil (BU) anstelle von Thymin (T) in die DNS von lebenden Zellen oder von Phagen wird die Inaktivierungsrate derselben nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen beträchtlich erhöht¹. Diese „Sensibilisierung“ könnte unter anderem durch die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit von BU und T in der DNS bedingt sein, aber auch durch die Natur der Radiolyseprodukte, die nicht in jedem Fall eine letale Wirkung haben und in unterschiedlichem Ausmaß eine Reaktivierung der geschädigten DNS zulassen werden. So erhält die Frage nach dem Mechanismus der Sensibilisierung durch BU ihr Interesse vor allem durch die Möglichkeit, allein durch den Vergleich des unterschiedlichen strahlenbiologischen Verhaltens zweier in gewissem Maß einander ersetzender Basen Einblicke in grundlegende strahleninduzierte chemisch-physikalische Reaktionen in der Zelle zu gewinnen.

Für den Fall der Strahlensensibilisierung von BU-haltigen *Enterococcus Stei* („schweren“ Zellen) durch Röntgenstrahlen wurde bereits von LOCHMANN² an Hand der Basen-Analyse von normalen und „schweren“ Zellen eine Erklärung dieser Erscheinung vorgeschlagen: Nach Verabreichung der gleichen Dosis (~ 1000 kr) war der prozentuale Abbau des BU in den schweren um das 5–10-fache höher als der des T in normalen Zellen; als Umwandlungsprodukt des BU wurde fast ausschließlich Uracil (U) gefunden. Die vorgeschlagene Erklärung für die Ursache der Sensibilisierung gründet sich auf die Annahme, die Bildung von U sei eine letale Mutation. Der Mechanismus, nach dem sich das U bildet, bleibt ungeklärt, ebenso wie es unbewiesen

bleibt, ob U in der DNS dieser Zellart letal wirkt.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, durch die Untersuchung der Kinetik des Abbaus von BU bei Bestrahlung unter N_2 , O_2 und N_2O mit den γ -Strahlen von ^{60}Co einen ersten globalen Überblick über die auftretenden strahlenchemischen Reaktionen zu gewinnen.

Experimenteller Teil

BU wurde in Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l in dreimal dest. Wasser gelöst und mit einer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung von $p_{\text{H}}=6,5$ versetzt, so daß die Konzentration des Puffersalzes doppelt so hoch war wie die des BU. Zur Bestrahlung unter N_2 wurden die BU-Lösungen in Ampullen 20 Min. mit O_2 -freiem N_2 gespült und abgeschmolzen. Bei den Versuchen mit O_2 leiteten wir während der Bestrahlung O_2 durch die Lösungen, so daß die O_2 -Konzentration konstant und gleich der Sättigungskonzentration war: $1,3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l. N_2O wurde durch Ausfrieren bei -80°C und Abpumpen der nicht kondensierten Gase (O_2) gereinigt und in einer geschlossenen Glasapparatur über die vorher durch freeze-pumping entgasten BU-Lösungen geleitet. Nach Abschmelzen der Lösungen enthaltenen Ampullen und Einstellen des Gasgleichgewichts betrug der Partialdampfdruck des N_2O 350 ± 30 mm Hg, dies entspricht einer Konzentration des N_2O in der BU-Lösung von etwa $1 \cdot 10^{-2}$ Mol/l³. Die Bestrahlung erfolgte in einer ^{60}Co -Quelle mit einer Dosisleistung von $6 \cdot 10^5$ r/Stunde.

Die Menge des nach Bestrahlung unzerstörten BU wurde durch Messung der Lichtabsorption bei 274 m μ auf parallelem Wege direkt und nach erfolgter chromatographischer Isolierung des BU von den Radiolyseprodukten ermittelt. Es stellte sich heraus, daß bei Bestrahlung unter O_2 die direkt und die nach Chromatographie gefundenen Werte innerhalb der Fehlergrenze des letzten Verfahrens übereinstimmten, so daß es in

¹ B. DJORDJEVIC u. W. SZYBALSKI, J. exp. Medicine 112, 509 [1960]; G. HOTZ u. K. G. ZIMMER, Int. J. Rad. Biol. 7, 75 [1963]; F. W. STAHL et al., Virology 13, 98 [1961].

² E. R. LOCHMANN, Naturwissenschaften 50, 520 [1963].

³ K. D. ASMUS u. A. HENGLEIN, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 68, 348 [1964].

diesem Falle möglich war, die genauere direkte Messung anzuwenden; die Fehlerbreite beträgt etwa ± 3 Prozent. Wie der Vergleich der beiden Messungen zeigte, bilden sich dagegen bei Bestrahlung unter N_2 und N_2O UV-absorbierende Stoffe und man erhält erst nach chromatographischer Trennung gültige Werte für den Abbau des BU. Vor dem Auftragen auf das Chromatogramm mußten die Lösungen konzentriert werden; dies erfolgte durch Gefriertrocknung und Lösen der getrockneten Substanz in einem entsprechend kleineren Volumen Wassers. Zur chromatographischen Trennung wurden Kieselgelschichten verwendet, als Laufmittel diente ein Gemisch von Äthylacetat und 65-proz. wässrigem Isopropanol 75 : 25. Als Fehlerbreite für die Bestimmung des BU ergab sich etwa ± 8 Prozent.

Ergebnisse und Diskussion

Die Abnahme der BU-Konzentration in Abhängigkeit von der Dosis bei Bestrahlung in wässriger Lösung unter N_2 , O_2 , N_2O läßt sich bis zu einem Abbaugrad von etwa 50% in halblogarithmischer Auftragung als Gerade graphisch darstellen (Abbn. 1, 2, 3). Die bei der Bestrahlung unter N_2 und N_2O erhaltenen initialen G -Werte sind innerhalb der Fehlergrenzen der BU-Bestimmung unabhängig von der Ausgangskonzentration des BU (Abb. 4) und betragen im Mittel

$$G_{-Bu}^{(N_2)} = 7,50 \quad \text{und} \quad G_{-Bu}^{(N_2O)} = 5,50.$$

Bei der Bestrahlung mit O_2 steigt dagegen der G -Wert mit der Anfangskonzentration des BU stark

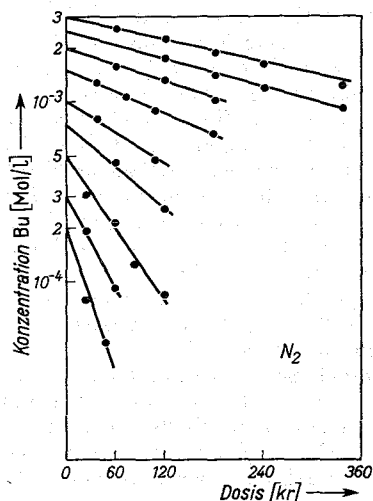


Abb. 1. Strahlenchemischer Abbau des BU in wässriger Lösung bei verschiedenen Konzentrationen durch γ -Bestrahlung in Gegenwart von N_2 .

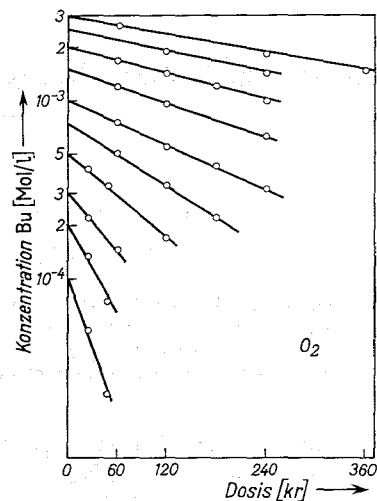


Abb. 2. Abbau des BU in wässriger Lösung bei verschiedenen Konzentrationen durch γ -Bestrahlung in Gegenwart von O_2 .

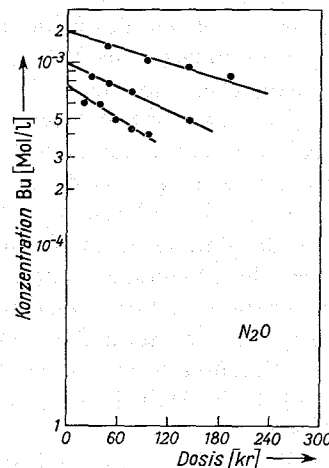


Abb. 3. Abbau des BU in wässriger Lösung bei verschiedenen Konzentrationen durch γ -Bestrahlung in Gegenwart von N_2O .

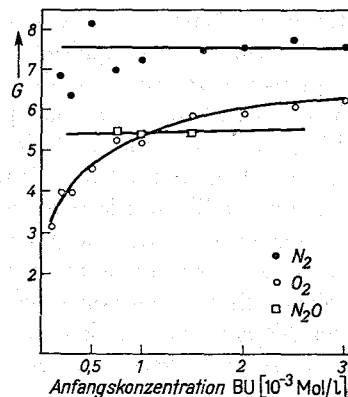


Abb. 4. Abhängigkeit der G -Werte des Abbaus des BU von der Konzentration bei γ -Bestrahlung wässriger BU-Lösungen in Gegenwart von N_2 , O_2 und N_2O .

an (Abb. 4); die extremen gemessenen Werte be-
tragen bei

$$(BU)_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l: } G_{-BU}^{(O_2)} = 3 \quad \text{und bei}$$

$$(BU)_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l: } G_{-BU}^{(O_2)} = 6,4.$$

Diese G -Werte lassen bei Berücksichtigung der zu-
letzt von HAYON⁴ für die Radiolyse wäßriger Lösun-
gen ermittelten G -Werte der „Wasserradikale“ eine
sehr einfache Deutung zu. Danach reagieren in ver-
dünnten wäßrigen Lösungen bei neutralem p_H -Wert
die bei der Radiolyse des Wassers gebildeten Spe-
cies H^{\cdot} , OH^{\cdot} , e_{aq} innerhalb eines definierten Kon-
zentrationsbereichs entsprechend folgenden G -Werten
mit dem gelösten Stoff (S)

$$G_H = 0,55; \quad G_{OH} = 2,25; \quad G_{e_{aq}} = 2,30.$$

Die Grenzen dieses Konzentrationsbereichs sind
abhängig von der Geschwindigkeitskonstanten der
Reaktion eines „Wasserradikals“ (R) mit dem ge-
lösten Stoff $k_{(R+S)}$ und durch die Beziehungen
 $k_{(R+S)}C_S \cong 10^5$ als untere und $k_{(R+S)}C_S \geq 10^7$ als
obere Grenze definiert. Während bei Konzentrationen
 $C_S < 10^5/k_{(R+S)}$ die Radikalreaktionen mit dem
gelösten Stoff zugunsten der Radikalrekombination
abnehmen, erhöht sich ihr Ausmaß bei $C_S > 10^7/k_{(R+S)}$
auf Kosten der Rekombination der in der
„spur“ gebildeten Radikale. Bei einer Geschwindig-
keitskonstante $k_{R+S} = 1 \cdot 10^{10} \text{ Mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ steigt da-
bei der G -Wert von OH^{\cdot} und e_{aq} um etwa 0,3 bei
einer Erhöhung der Konzentration um das 10-fache.
Im Falle der Bestrahlung von wäßrigen N_2O -Lösun-
gen reagiert das hydratisierte Elektron mit N_2O
unter Bildung von OH^{\cdot} Radikalen: $N_2O + H_2O^{\ominus} \rightarrow$
 $N_2 + OH^{\cdot} + OH^{\ominus}$ mit einer Geschwindigkeitskonstan-
ten von $8,7 \cdot 10^9 \text{ Mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Bei der von uns ange-
wandten N_2O -Konzentration $C_{N_2O} = 1 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ be-
tragen daher die G -Werte von e_{aq} und OH^{\cdot} : $G_{e_{aq}} =$
 $2,55; G_{OH^{\cdot}} = 2,50$.

Für unsere Versuche unter N_2 können wir in
erster Annäherung annehmen, daß die untersuchten
BU-Konzentrationen im Bereich der oben definierten
verdünnten Lösungen liegen und daher die ange-
gebenen G -Werte gelten. Würden die Wasser-
radikale, ohne miteinander zu interferieren, jeweils
ein BU-Molekül abbauen, so wäre bei Bestrahlung
unter N_2 der G -Wert des BU-Abbaus gleich der
Summe $G_H + G_{OH^{\cdot}} + G_{e_{aq}} = 5,10$. Wir finden $G_{-BU}^{(N_2)}$
 $= 7,50$. Man kommt nun diesem experimentellen
 G -Wert sehr nahe, wenn man in diese Summe die
 G -Werte von entweder OH^{\cdot} oder e_{aq} mit dem Fak-

tor 2 einsetzt:

$$G_H + 2 G_{OH^{\cdot}} + G_{e_{aq}} = 7,35 \quad \text{oder} \quad G_H + G_{OH^{\cdot}} + 2 G_{e_{aq}} = 7,40.$$

Folglich sollte entweder das OH^{\cdot} -Radikal oder das
hydratisierte Elektron eine Zweistufenreaktion aus-
lösen. Diese Frage konnte durch die Versuche mit
 N_2O entschieden werden. Die Konzentration des
 N_2O war im ungünstigsten Falle etwa sechsmal
höher als die des BU und man kann daher bei der
hohen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion
 $N_2O + e_{aq}$ erwarten, daß sämtliche e_{aq} von N_2O ab-
gefangen werden, bevor sie mit dem BU reagieren.
Bei der angewandten Konzentration und unter der
Annahme, daß je ein OH^{\cdot} -Radikal mit einem BU
reagiert, wäre für den Abbau des BU ein G -Wert
 $G_{-BU}^{(N_2O)} = 0,55 + 2,50 + 2,55 = 5,6$ zu erwarten. Ge-
funden wurde $G_{-BU}^{(N_2O)} = 5,4$. Es ist somit gezeigt, daß
bei der Radiolyse wäßriger BU-Lösungen die Radi-
kale H^{\cdot} und OH^{\cdot} je ein, das hydratisierte Elektron
jedoch in einer Folgereaktion zwei BU-Moleküle
chemisch umwandeln.

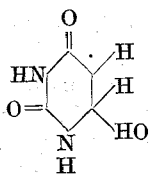
Bei den Versuchen mit O_2 bleibt es wegen der
relativ niedrigen O_2 -Konzentration unsicher, in
welchem Ausmaß die Reaktionen $e_{aq} + O_2 \rightarrow O_2^{\ominus}$
 $H^{\cdot} + O_2^{\ominus} \rightarrow HO_2^{\cdot} \rightleftharpoons O_2^{\ominus} + H^{\oplus}$ mit den entspre-
chenden Reaktionen des BU konkurrieren. Die Tatsache,
daß bei einer Konzentration des BU $= 3 \cdot 10^{-3}$ der
 G -Wert des BU-Abbaus mit 6,4 höher liegt als der
der einfachen Summe der G -Werte der Wasserradi-
kale zeigt jedoch, daß bei dieser Konzentration in
gewissem Umfang noch eine Zweistufenreaktion
stattfindet. Da bei kleiner BU-Konzentration das
Ausmaß des Abbaus sich stark verringert, wird
diese Zweistufenreaktion nicht durch das O_2^{\ominus} aus-
gelöst, sondern durch die von der Konkurrenzreak-
tion des O_2 nicht abgefangenen e_{aq} . Dieser Befund
spricht für eine große Reaktivität des e_{aq} mit dem
BU, da die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion
 $O_2 + e_{aq}$ mit $k_{O_2 + e_{aq}} = 2 \cdot 10^{10} \text{ Mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ sehr
hoch liegt. Die Frage, ob das BU von O_2^{\ominus} ange-
griffen wird, kann durch diese Versuche nicht be-
antwortet werden.

Aus unseren Untersuchungen ist bei Berücksichti-
gung des strahlenchemischen Verhaltens von Pyri-
midin-Verbindungen einerseits und Halogenverbin-
dungen andererseits ein allgemeines Schema für den
Reaktionsablauf bei der Radiolyse wäßriger BU-

⁴ E. HAYON, Trans. Faraday Soc. 61, 723 [1965].

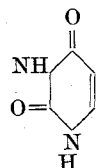
⁵ F. S. DAINTON, u. D. C. WALKER, Proc. Roy. Soc. [London],
Ser. A 285, 339 [1964].

Lösungen in Anwesenheit von Radikalfängern zwanglos abzuleiten. Ausgangspunkt ist dabei der Befund, daß die Radikale H^\cdot und OH^\cdot mit dem BU ein relativ stabiles Radikal bilden, das sich durch Reaktionen mit anderen Radikalen zu einem neutralen Molekül umwandelt, während sich mit dem hydratisierten Elektron ein sehr reaktives Radikal bildet, das ein weiteres BU-Molekül angreift. Von Uracil-Derivaten (z. B. Thymin) ist bekannt, daß sie bei Bestrahlung in wäßriger Lösung vorzugsweise H^\cdot und OH^\cdot an die 5.6-Doppelbindungen addieren⁶; das gebildete Hydrouracilradikal



ist relativ stabil. Halogen-Derivate reagieren in allgemein sehr schnell mit dem hydratisierten Elektron unter Abspaltung des Halogens als Anion und Bildung eines Radikals. Im Falle von Bromuracil würde sich also das Uracil-Radikal bilden

⁶ G. SCHLES, *Progr. Biophysics molecular Biol.* 13, 60 [1963].
⁷ A. KAMAL u. W. M. GARRISON, *Nature [London]* 206, 1315 [1965].



von dem eine hohe Reaktivität zu erwarten ist. Vergleicht man, im Hinblick auf die Strahlensensibilisierung BU-haltiger Zellen, das strahlenchemische Verhalten in wäßriger Lösung von T⁶ und BU, so ist wohl der wichtigste Unterschied darin zu suchen, daß nur im Falle von BU ein sehr reaktives Radikal entsteht, das Uracilradikal, das fähig ist, ein weiteres neutrales Molekül abzubauen. Thymin addiert an die 5.6-Doppelbindung nicht nur H^\cdot - und OH^\cdot -Radikale, sondern auch das hydratisierte Elektron⁷; es wurde aber bisher keine Reaktion zwischen einem Thyminradikal und einem neutralen Molekül nachgewiesen. Daher scheint die Hypothese berechtigt, als eine der Ursachen der Strahlensensibilisierung durch BU die Bildung des Uracilradikals in der Zelle anzusehen: Dieses Radikal könnte durch Reaktion mit neutralen Molekülen oder durch Zerfall diffusible Radikale erzeugen, die die Zelle über das in normalen Zellen festgestellte Ausmaß hinaus schädigen.

Optische Analyse der Sedimentation in der präparativen Ultrazentrifuge

W. GÜNTHER, T. MOHR, G. HOTZ und A. MÜLLER

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum
Karlsruhe

(Z. Naturforschg. 20 b, 807—808 [1965]; eingegangen am 5. Mai 1965)

Die Einführung stabilisierender Gradienten in die Technik der Ultrazentrifugation¹ ermöglicht die Verwendung der präparativen Ultrazentrifuge bei vielen Problemen, die sonst nur mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge untersucht werden konnten. Da eine analytische Ultrazentrifuge im Gegensatz zur präparativen nur in wenigen Laboratorien zur Verfügung steht, ergeben sich viele Anwendungsmöglichkeiten für diese neue Methode.

Bei der analytischen Ultrazentrifugation werden die Sedimentations-Eigenschaften der untersuchten Substanz spektralphotometrisch bestimmt. Diese Methode kann bei der präparativen Ultrazentrifugation ebenfalls benutzt werden und stellt eine wertvolle Ergänzung zu anderen Verfahren dar, insbesondere der Bestimmung der biologischen Aktivität. Zur optischen Analyse kann ein gewöhnliches Spektralphotometer mit Hilfe eines einfachen Zusatzgeräts eingerichtet werden. Eine derartige Anordnung, wie sie in unserem Laboratorium konstruiert und erprobt wurde, wird im folgenden beschrieben.

Als Probengefäße für Zentrifugation und Absorptionsmessung dienen Quarzröhrchen von 10 mm Durchmesser, 1 mm Wandstärke und 45 mm Länge, die in die ausschwingenden Behälter eines „swinging bucket“ Rotors eingesetzt werden. Bei unseren Versuchen wurde eine präparative Ultrazentrifuge vom Typ Spinco mit Rotor SW 39 benutzt. Zur optischen Analyse der erzielten Sedimentation werden die Röhrchen vorsichtig der Zentrifuge entnommen und unter Vermeidung von Erschütterungen in Quarzküvetten eingesetzt, wie sie normalerweise zur Spektralphotometrie verwendet wer-

den. Den Zwischenraum zwischen Röhrchen und Küvette, der durch zwei Abstandsringe an Boden und Deckel definiert wird, füllt man zur Herabsetzung der Lichtbrechung mit reinem Wasser. Da die Variation der optischen Eigenschaften in Richtung der Achse des Röhrchens gemessen werden soll, benötigt man am Ort des Röhrchens ein horizontales Lichtband von rechteckigem Querschnitt. Dieses Lichtbündel muß in vertikaler Richtung so schmal sein, daß möglichst alle Änderungen der beobachteten Eigenschaft aufgelöst werden, während seine Breite in horizontaler Richtung den Durchmesser des Röhrchens nicht übertreffen darf.

Als Spektralphotometer wurde ein Zeiss-Gerät, Typ PMQ II, verwendet. An Stelle des mitgelieferten Probenwechslers wurde zwischen Monochromator und Empfängergehäuse ein Zusatzgerät eingesetzt, dessen wesentliche Teile in Abb. 1 schematisch dargestellt sind.

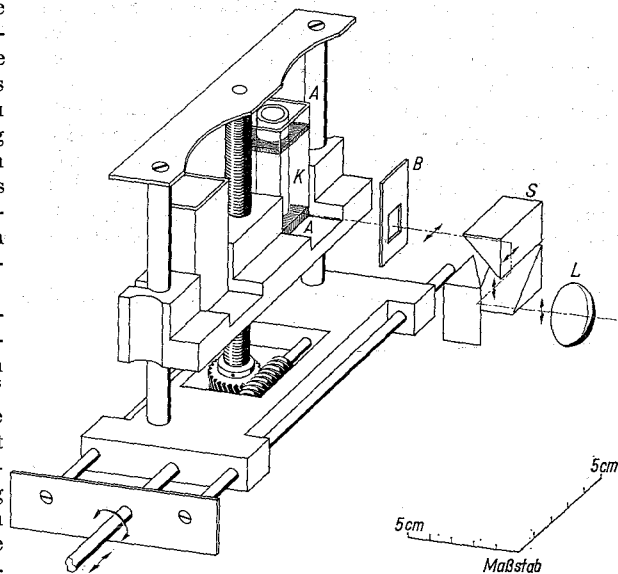


Abb. 1. Schematische Darstellung des Zusatzgeräts zum Spektralphotometer. Das äußere Gehäuse und der Antriebsmotor sind nicht mitgezeichnet. K: Quarzküvette, A: Abstandsringe aus Teflon, B: Blende, S: Spiegelsystem, L: Quarzlinse.

¹ C. DE DUVE, J. BERTHET u. H. BEAUFAY, Gradient centrifugation of cell particles: Theory and applications. Progr. Biophys. 9, 325 [1959].

Zwar enthält die wiedergegebene Konstruktion nur einfache Elemente, doch ist auf präzise und solide mechanische Ausführung großer Wert zu legen, da die einwandfreie Funktion des Geräts davon stark abhängt. Der optische Teil dient zur Drehung des vertikalen Lichtbündels, das aus dem Spalt des Monochromators austritt, um 90° sowie zur Abbildung des Spalts auf das Probenröhrchen im Verhältnis 1 : 1. Dies wird mit Hilfe des Spiegelsystems S und der Quarzlinse L (Brennweite 50 mm) erreicht. Die Blende B begrenzt das Bild des Spalts auf 6 mm Breite. Das Spiegelsystem ist aus drei oxydationsgeschützten Aluminiumspiegeln (20 mm · 25 mm) zusammengesetzt, die jeweils um 45° gegen die optische Achse geneigt und zur genauen Justierung auf Metallprismen aufgeklebt sind.

Zur Messung wird die Küvette mit eingesetzten Probenröhrchen mit konstanter Geschwindigkeit in vertikaler Richtung am Lichtbündel vorbei bewegt. Der Antrieb erfolgt durch einen stark untersetzten Elektromotor über ein Schneckengetriebe und eine Schraubenspindel. Die Vorschubgeschwindigkeit der Küvette kann zwischen 0,06 mm/sec und 0,2 mm/sec variiert werden. Das die Küvette durchdringende Licht wird von einem Photovervielfacher aufgenommen, der zur normalen Ausrüstung des Spektrometers gehört. Die abgegebene Spannung wird von einem Kompensations-Linienschreiber registriert, der mit konstanter Geschwindigkeit angetrieben wird. Außer der Absorption, die durch Differenzbildung mit der durchgelassenen Intensität außerhalb eines Absorptionsbandes gewonnen wird, kann vom Schreiber mit Hilfe eines vorgeschalteten Wandlers auch die dekadische Absorptionskonstante (in der Technik auch häufig Extinktion genannt) aufgezeichnet werden.

Zur Demonstration der Arbeitsweise des Geräts verwendeten wir als Versuchsobjekt Bakteriophagen der Stämme T1 und Φ X-174. Rohe Lysate dieser Stämme wurden ohne zusätzliche Reinigung zusammen mit „schweren“ T1-Phagen, d. h. solchen, deren Dichte durch den Einbau von 5-Bromuracil an Stelle von Thymin in die Nucleinsäure vergrößert worden war, nach der Methode von MESELSON, STAHL und VINOGRAD² in einer Lösung von Caesiumchlorid (72% CsCl in 1/15-m. Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, pH 7) suspendiert und

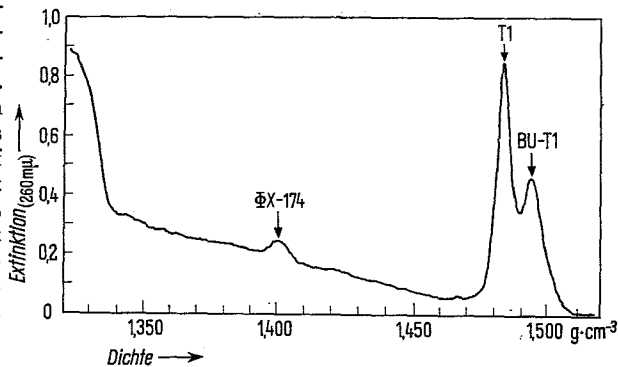


Abb. 2. Registrierkurve der Extinktionskonstanten gegen die Dichte. Der linear mit der Dichte abnehmende Untergrund rührt vom Phagenpuffer (gesättigte Boratlösung) her. Die mit T1 bezeichnete Linie entspricht einer Absorption von $3 \cdot 10^{10}$ Phagen. Spaltbreite des Spektralphotometers 0,01 mm.

bis zum Eintreten des Gleichgewichtszustandes (20 Stdn. bei 35 000 UpM) zentrifugiert. In Abb. 2 ist die von den Sedimentationsbanden der Phagen verursachte Extinktion bei $260 m\mu$, dem Absorptionsmaximum der Nucleinsäure, und 0,01 mm Spaltbreite dargestellt, wie sie vom Linienschreiber beim Durchlaufen eines Zentrifugenröhrchens registriert wird. Da die Caesiumionen bei der Zentrifugation einen Konzentrations-Gradienten und damit auch einen Dichtegradienten bilden, der praktisch linear ist, kann auf der Abszisse der Abb. 2 die Dichte in linearem Maßstab aufgetragen werden, der durch ein mitzentrifugiertes Referenz-Material erreicht wird. Die Bande, die bei der Dichte 1,40 zu sehen ist, rührt von Phagen des Stammes Φ X-174 her, während die Doppelbande bei höherer Dichte von normalen und schweren T1-Phagen verursacht wird. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist so, daß noch etwa $5 \cdot 10^8$ Phagenteilchen mit einem entsprechenden DNS-Gewicht von insgesamt $5 \cdot 10^{-8}$ g in einer Bande mit guter Genauigkeit nachzuweisen sind.

Herrn Dipl.Phys. G. GUTHÖRLEIN danken wir für die Herstellung der Spiegel und der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, für einige hilfreiche Hinweise.

² M. MESELSON, F. W. STAHL u. J. VINOGRAD, Proc. nat. Acad. Sci. 43, 581 [1957].