

Preparation and length measurements of the total DNA content of T₂ bacteriophages: a commentary by

Albrecht K. Kleinschmidt

Institut für Mikrobiologie der Universität Ulm, Ulm (F.R.G.)

on 'Darstellung und Längenmessungen des gesamten
Desoxyribonucleinsäure-Inhaltes von T₂-Bakteriophagen'
by A.K. Kleinschmidt, D. Lang, D. Jachertz and R.K. Zahn
Biochim. Biophys. Acta 61 (1962) 857–864

For the millennial volume of *Biochimica et Biophysica Acta* the Editors have selected our paper on molecular electron microscopy of T2 coliphage and its DNA for reprinting, even though the manuscript is not written in the lingua franca of scientists of the time. The authors are all the more thankful for this benefit. I would like to comment on the techniques and their interpretation with personal thoughts and afterthoughts, reflecting on the time before monolayer techniques for biomacromolecules were combined with molecular microscopy. In exploring historical sources for light and electron microscopy of biomatter down to molecular dimensions, progress is substantiated by the instrumentation itself. Electron microscopy of monolayered macromolecular complexes, however, is also rooted in the physics and chemistry of surface phenomena, and these also deserve some interpretative comments.

After the period of invention of monolayer images of dispersed macromolecules, it soon became evident that the impact of molecular morphology, or molecular anatomy as it was also originally called, was immense in the fields of biochemical structure research in molecular and cell biology and molecular genetics. In the following period, some successors took the imaging of a small collection of biomacromolecules simply as illustrative for the apparently larger task of preparing and interpreting molecular bulk data of the biological object under study. After all, the monolayer electron microscopy of biomacromolecules gives such beautiful static images. This technique has been gradually developed into a multistep but finite biochemical technique with biophysical components. A main methodological goal is attained for mostly linear biomacromolecules as a marker analysis along information carriers. Of course, these techniques have to struggle against artefacts of their own. Although artificial implications may be many, users call the monolayer techniques a classical molecular topology with numerous applications.



Albrecht K. Kleinschmidt

The real novelty of biomolecular imaging in standard procedures is embodied in the potential of selecting appropriate still pictures of individual macromolecules, very different from most of the physical and chemical methods of biomacromolecular integral structure analysis. The first step is always biochemical; it can mean isolation, purification or reconstitution. Prior to mount-

ing onto a microscopic support, chemical reactions on the biomatter permit the addition of markers such as antibodies, crosslinkers, nucleic acid-binding enzymes and substrates. Important steps are denaturation and renaturation, or nucleic acid hybridation to form heteroduplexes, depending on the environment. Another procedure is partial denaturation mapping at adenylthymidyl-rich positions of duplex DNA. Removal of specific or unspecific impurities of cells or organelles, or enzymatic splitting of macromolecules is another category of processing for proper imaging. The change from a three-dimensional bulk solution to a two-dimensional monolayer in surface solution often makes further purification unnecessary. On the other hand, artificial collapse of nucleic acids and proteins already occurs in solution, for example with alcohols. The tertiary structure of DNA and RNA can also undergo considerable segmental changes during mounting, staining and drying onto the electron microscopic solid support film. This is considered to be the main source of artefacts in imaging two-dimensionally oriented macromolecules. The mounting and drying process has been studied in many successful experiments, also with omission of the primarily obligatory protein monolayer of cytochrome *c*. These studies contributed considerably to the progress of the recent years.

By simple arithmetic applied to linear microscopic data, inductive reasoning allows quantitative formation of one-dimensional models by the image itself. Of course, the most impressive photograph is preferable. Already existing vague models are being substantiated by a few model-equivalent molecular images selected from many macromolecules that are spread in a mixed surface film. In this way, a further purification procedure for the object under study can be avoided. Appropriate resolution of image details should not be sought in the range of monomers, amino acids or nucleotides within a polymeric structure. Increasing complexity in both size and preparative procedures of the chosen object will cause the investigator to construct more integral though reductionistic models based on electron microscopy. Many publications no longer show electron micrographic macromolecular images.

Given the intricacy of biomatter, for example in cellular organelles, these straightforward biochemical imaging methods applied to natural, or artificially distorted complexed molecules in supraorganization may read to less defined quantitative results. A good example is presented in the above paper from 1962, where 'osmotic shock' causes the phage ghost to be centered in a tangle of viral DNA and thus limits the measurability of total length. Not having completely opened the cell and organelle structure by 'spreading', the procedures empirically applied give rise to whole mounts or intermediates of submicroscopic structures in purposely stepwise loosening of non-covalent bonds. They provide

morphological molecular information on the level of compartmentalized cell biological material. From the mainly biochemical approach of the methods subsumed here, a similar potential will hardly be attained by other biochemical topological techniques.

Historical remarks on the development of microscopy should commemorate actual anniversaries from the very beginning. A wealth of data has to be named here. Antoni van Leeuwenhoek was the first to describe protozoa, erythrocytes and bacteria (published 1688 in Ref. 1) as 'animalcules' using a simple microscope most probably first constructed by the Jansens (1590) [2]. Consistent with the poor resolution were the attempts to interpret the results in cell research. Three centuries ago, there were very few amateur or professional researchers; publishing was an endeavour of a few scientists.

It was a long way to the construction of compound light microscopes based on achromatic lenses, which Carl Zeiss (1816–1888 [3]) achieved following the advice of the young physicist, Ernst Abbe. From 1873 on, Abbe used the wave theory of light in lens construction and microscope design. He described the real image as the secondary image, while the primary one was named virtual (in reciprocal space). Concerned with useful light microscopic resolution, which lies in the region of half of the optical wavelength used, Abbe wrote: "Perhaps in the future, the human genius might invent forces and processes that cross existing barriers yet unsurmountable... but it is my belief that the methods will be developed being able to support studies on molecular (and atomic) structures. Our current microscopes will have nothing more in common than their name, with instrumentation to come" [4]. How correctly prophesied!

The first practical application of electrons was the electron tube as a source of X-rays. Wilhelm C. Roentgen (1895) used an X-ray tube to make the human body translucent, essentially by scattering X-rays mainly on calcium phosphate of bones. The progress of invention was accelerated by the demonstration of the first electromagnetic lenses by Hans Busch in 1925. At the end of the twenties everything was ready for an electron microscope of practical design [5].

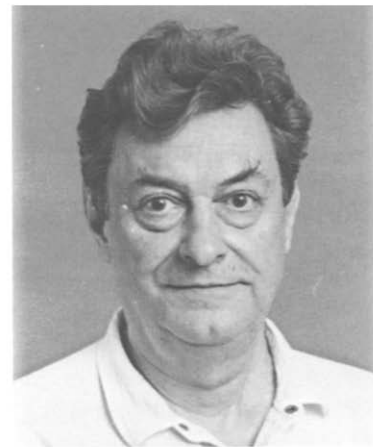
The instrumentation was concurrently developed (1929–1939) in various laboratories, in Berlin by Manfred von Ardenne and by the research group of Max Knoll at the Technical University. Not only did M. Knoll and Ernst Ruska (1932 [6]) provide the foundation for the practical design of magnifying electromagnetic lenses, but E. Ruska also described the first imaging of biological matter (1934 [7]) by mounting macromolecular complexes of cotton threads on supporting grids. Magnification still was not satisfactory; the claim of being beyond the resolution of contemporary light microscopy, and thus of having presented



Dimitrij Lang



Diether Jachertz



Rudolf K. Zahn

the 'Übermikroskop', was slowly fulfilled by improvements of electron optics, microscope design and preparation methods to which also Helmut Ruska (+ 1973) contributed, mainly on virus research and cell structure. A full report from the first generation of transmission electron microscopes, with all their technical improvements (and these instruments are still the most used high-resolution microscopes for biomacromolecules), is given by V.E. Cosslett [8], and should be compared with one of the first books on 'Übermikroskopie', a 40-year-old publication by Bodo von Borries [9].

The international cooperative efforts of electron microscope designers, and those interested in preparing cells and cell components, was spreading fast, from the end of the thirties, as shown by many reviews, such as Ref. 9 and many other articles and books, see Ref. 8. It soon became obvious that image formation contained hidden or visible artefacts introduced by electron optics and preparative procedures. Until these were minimized, macromolecular imaging would not be satisfactory and could present spurious structures or real faults. From microscope instrumentation arose lens aberrations such as astigmatism, phase contrast effects, i.e., high-resolution spurious structures, object contamination by the electron beam, poor contrast in bright and dark field and many other, minor sources of image artefacts. Preparative procedures introduced artefacts or poor imaging due to thick specimens and support films, instability of specimen structure, especially when dried under room conditions, and by heavy-contrasting procedures (positive appositional or negative contrast by electron-dense stains).

During the first two decades, and later on, the mutual stimulation of instrumentation engineers and preparative improvements brought considerable advances in biomolecular imaging. Most studies were carried out at relatively low magnifications, for example for DNA 10^4 -times operational magnification, when large sample

series of biomacromolecular imaging were scrutinized. Good contrast of the DNA objects was necessary, and could be achieved best by rotary deposition of heavy metals, i.e., by platinum. But new devices in electron optics, such as an integrated imaging electron energy spectrometer in a transmission electron microscope, permit observation of the non-contrasted duplex DNA through the phosphate 'window' of a polynucleotide, with about the same resolution as in the monolayer preparations, and of the same high contrast as shown by positive stain, and/or Pt deposition. The scanning transmission electron microscopes can be fully explored for making good dark-field images with or even without appositional contrast.

Comparable progress in interfacial monolayers of biomolecules was already under scrutiny in the 19th century. At the end of the century, Agnes Pockels, a researcher without academic position or honours at Göttingen, wrote 1891 to Lord Rayleigh, and her letter [10] on insoluble monolayer studies mainly of fatty acids on air/water interfaces [11] was published in 'Nature'. Her contribution also comprised the estimated dimensions of insoluble monolayers with thicknesses in the range of 2 nm or 20 Å, simply by weighing and showing, with talcum powder, the border of the surface film which had been built up. This soon gave rise to a wealth of publications on the mechanics and structured properties of insoluble and partly soluble films in the air/water, liquid/liquid and solid/liquid interphases, with respect to biological phenomena. Irwin Langmuir was rated highly as a researcher on these matters. He was more concerned with solid surfaces, adsorption forces, the turnover of oriented molecules, the measurements of monolayer thickness (Blodgett and Langmuir [12]) than with interfacial phenomena at air/liquid phases. From the beginning, spread-out protein films were not neglected (for historical reviews see Langmuir and Schaefer [13], Trurnit [14] and Höber [15]). Here,

only a few features of protein monolayers should be named, to the advantage of monolayer studies employing electron microscopy.

When easily denaturable globular proteins in solution (hyperphase), such as egg albumin or insulin, were introduced into the air/water (hypophase) interface at room temperature, the partial or total unfolding of the aminoacyl chain to an insoluble monolayer was called surface denaturation. The spread films were insoluble and, when compressed or decompressed, showed intrinsic visco-elastic film properties. Prerequisites were proper, usually low, salt concentration of the hypophase, choosing pH values in, or far from, the isoelectric point of the soluble protein under study. Special devices are not required to cause the protein to spread completely. Just as in beaten egg white, the glycoprotein molecules come to surface by diffusion and unfold under favourable conditions. Extreme care has to be given to the freeing of water surfaces from surface activity. Fully spread proteins should occupy about 1 m²/mg protein. A protein which is often used is cytochrome *c*. Its film properties [16] are exemplary for protein spreading. When macromolecules such as double-stranded DNA were added to a cytochrome *c* solution, it was found [17] that, in solution, maximum ligand formation occurred under 0.15 M salt (ammonium acetate) at 20°C and pH 7 (while the isoelectric point lies at 10.7 due to 11 lysine residues in excess). The maximum protein film size of cytochrome *c* occurred at pH 2 with the loss of the haem chromophoric group in the hypophase [16]. In the case of cytochrome *c* (and many other spreadable proteins, e.g., methylated albumin), no binding of duplex DNA occurred below pH 5 or above pH 12 [17].

Complexed protein monolayers were characterized by some physical and also chemical properties; occupancy of a protein film under a two-dimensionally applied pressure (in force/area (F/A) plots; dimensions: newton or dyn/cm vs. cm²). The applied force left the film completely surface-denatured and insoluble, with regard to film compression and decompression. The film was stable over long periods of time (ageing), and variably penetrable for other diffusing molecules. Researchers such as E. Gorter and F. Grendel [18] and Gorter [19] recognized the influence of the (then unknown) primary structure of proteins with charged basic and acidic side-chains, including their hydrophilic and hydrophobic properties in film spreading. A complex of protamin and insulin, for example, easily spreads at pH 7, while the former alone does not spread at all (due to too many hydrophilic surface charges), and the latter has an optimal surface spreading at pH 5 [20]. Unfolding of proteins in interfaces seems to be influenced not only by the interfacial surface tension (72 dyn/cm at air/water) but also by reordered water molecules in the upper layer, called soft

ice. This makes comparison of chemical and physical bulk characteristics difficult to evaluate.

The first electron micrograph of long DNA prepared according to the protein monolayer techniques was published applying unidirectional contrast enhancement through platinum that was deposited, or shadowed, under a grazing angle of 84° incidence [21]. Later on, rotary shadowing and portrait shadowing (with emphasis in one direction) came into use. At that time we were naïve enough to believe we had found the most direct visualization characteristic for linear double-stranded DNA. The facts were, however, that random double-strand breaks produced a collection of randomly size DNA fragments of a relatively stiff nature according to their isolation and purification. A periodicity in size distribution of these fragments vanished when further experiments under improved isolation procedures were carried out. As a result of this, we looked for naturally defined short DNAs such as the virus genome of T-even coliphages. The intermediate purification of virus particles helped very much in preserving whole DNA lengths when extraction was done in a one-step release from the virions within the air/water interface. Later on, it was shown that duplex RNA segments of reoviruses have a loosely ordered linear connection within the nucleocapsid, while upon release a decisegmental size distribution of duplex RNA was found. The spreading of virus particles occurred with various concentrations of sodium perchlorates. The watery surface itself was then described by the location of further, though minor, reactions on complex linear macromolecules. The restriction enzyme analysis of DNA represented another major step towards electron microscopy of heteroduplex analysis of prokaryotic and eukaryotic alleles of cellular genomes, showing for the first time intron and exon topography of genes.

I should mention that, after the invention of microscopic protein monolayer techniques, an explosion of important experiments and publications, including reviews, began in the early sixties. On the advice of the Editors and because of the lack of printing space, I regret that I am not able to refer here to any individual paper as an important contribution to the progress of imaging monolayered biomacromolecules and natural complexes. For specific citations, the scientific libraries, or eventually the author, should be consulted.

After a short while, various principal rules became apparent. There seem to be no limitations in the transferring of the biochemical bulk experiments, during the structure studies of biomacromolecules, to two-dimensional electron microscopic imaging. In general, the transition from the three-dimensional to the two-dimensional state deserves caution. Double-strandedness is much easier to handle than an assembly of total single-strand nucleic acid molecules, or interspersed single-strand stretches along duplex strands. The hyperphase

permits denaturation by elevated temperatures above melting T_m , by a pH rise for DNA (up to pH 12.6 where single-strand breaks may occur), by adding associative denaturants, mainly purified formamide or urea, that stretch coiled single RNA and DNA strands, and/or reactive denaturants, formaldehyde or methyl mercury ions, to name but a few. Renaturation occurs only after associative denaturants are partly removed. The aldehydes and, for example, psoralens are used in the hyperphase to crosslink and intracrosslink nucleic acids with DNA (or RNA) binding proteins which may be sequence-specific (e.g., RNA polymerase, restriction enzymes, DNA antibodies of Z-conformation) or unspecific (e.g., gene 32 product of T4 coliphage, rec A protein). The spreading and maintenance of complex films is improved by adding denaturing agents to the hypophase. For example, 2% formamide added to pH 7 buffered (1 mM) water allows a better spreading of renatured DNA under 30–50% formamide, and in addition an imaging of extended terminal or interspersed single-strand segments.

After the recipes for preparation were published, researchers looked for further reasoning in terms of surface chemistry, and for rules and verification of physical chemical laws applicable mainly to DNA. Diffusion coefficients were deduced from DNA in solution by irreversibility of binding to a cytochrome *c* film, the radius of gyration was estimated to be 3-times larger than in solution, and in judging the bulk properties the spreading always tended to larger values, in occupied area and extended filaments. There was also a personal touch to the progress: it was based on the individual art of electron microscopy of nucleic acids in laboratory experience.

Problems arise when the physical chemistry of nucleic acid molecular forms in bulk solution is compared with the imaging of special forms within a protein film. Relaxed small circular duplex DNA (of DNA viruses, of mitochondria or chloroplasts, of trypanosomal kinetoplasts, and of minicircular chromatin elements, for example) do not create misleading results; they need internal standards of known length in basepairs (plasmid pR322, or derivatives, for example) as a control for length distribution. Supercoiled, or superhelical DNA at least is not imaged correctly due to the urge of deposition dry to supports. Under conditions of careful staining combined with minimal Pt rotary shadowing it seems reasonable to decide what are right-hand and left-hand turns in superhelical larger DNA.

With short circular RNA, however, correct preparations of naturally rodlike and partly de- and renatured viroid structures with high complementarity can be achieved only when conditions of intrastrand separation are maintained up to the mounting stage. These preparative steps are performed better with benzyldimethylalkylammonium chloride (BAC), another surface film

complexing minimally with DNA and RNA that very often replaces cytochrome *c*. Naked DNA to which a reactive protein (rec A) is firmly bound are mounted on a carbon support film which is eventually glow-discharged, followed by negative staining of careful rotary decoration of carbon-platinum in a high-vacuum evaporator. For short naked DNA (and the method is suitable only for a short DNA stretch) its B-conformation is demonstrated as a negatively stained zigzag duplex structure of correct dimensions.

Micromethods or droplet techniques are equally suitable, in the experimenter's apt hands. They are based on diffusion of DNA onto the top of a droplet (about 50 μ l) where cytochrome *c* forms a film. After a short while the top layer is transferred to a carbon-coated grid. A simplified method, called protein-free, is now in wide use, in the course of which preconditioned carbon support (3 nm thick) is used. By glow discharge, Alcian blue or (poly)lysine, for example, the conditioning of the carbon support as a mounting base permits the quantitative extraction from solution of nucleic acid samples which often are pretreated with aldehydes (formaldehyde 0.1 to 0.5%, better than glutaraldehyde). Such treatment stabilizes hydrogen bonds of complementary nucleic strands, and, in stronger fashion, proteins bound to DNA by covalently built-up crosslinks. Psoralens act in a similar way. After platinum enhancement, preparations are measured in lengths and in denatured segments only when adequate controls are introduced. It has been shown that BAC films extend the duplex DNA by 17% from its 100% length in cytochrome *c* films.

Chromatin spreading and chromosome spreading belong to the next higher category of imaging of extended protein-depleted nucleic acid complexes. This is valid, too, for nucleosomal and polynucleosomal structures. For a semiquantitative analysis of organellar cell elements of nucleic acids, centrifugation of nucleolar DNA-polyribosomal complexes onto preconditioned support films is of advantage in demonstrating growing polysomes. HeLa cell chromosomes show an intrachromosomal scaffold. For other complexes of cytoskeleton protein, also, and even for proteoglycans, much preparative advice is available. All the new inventions in molecular imaging are based on a semi-empirical progress. Probably, many methods will provide adequate results.

The dream of being able to see directly the molecular elements of life has been achieved after four decennia of experimental work. Those directly involved and also those who have supported the progress in the field of spread macromolecular imaging, mostly by electron microscopy, through their advice and financial support deserve our gratitude.

continued

References

- 1 Dobell, C.C. (1960) A. v. Leeuwenhoek and his Little Animals, Dover New York; A. van Leeuwenhoek (1695, 1697, reprinted 1966) Arcana naturae detecta, Brussels, Delphis batavorum.
- 2 Anonymous (1979) Encycl. Br. Vol. 3, 1058.
- 3 Gerlach, D. (1988) Mikrokomos 77, 265.
- 4 Hilger, W. (1987) Robert Koch Found. 10, 7; Hansma, P.K., Elings, V.B., Marti, O. and Bracker, C.E. (1988) Science 242, 209.
- 5 Ruska, E. (transl. Mulvey, T.) (1980) The Early Development of Electron Lenses and Electron Microscopy, Hirzel, Stuttgart.
- 6 Knoll, M. and Ruska, E. (1932) Ann. Physik 12, 607.
- 7 Ruska, E. (1934) Z. Physik 89, 90.
- 8 Cosslett, V.E. (1987) Adv. Opt. Electron Microsc. 10, 215.
- 9 Von Borries, B. (1949) Die Übermikroskopie, Aulendorf(D) Cantor.
- 10 Pockels, A. (1891) Nature 43, 437.
- 11 Lord Rayleigh (1899) Philos. Mag. 48, 321.
- 12 Blodgett, C. and Langmuir, I. (1937) Phys. Rev. 51, 964.
- 13 Langmuir, I. and Schaefer, A.E. (1938) J. Am. Chem. Soc. 60, 1351, 2803.
- 14 Trurnit, H.J. (1945) Fortschr. Chem. Organ. Nat.st. 4, 347.
- 15 Höber, R. (1945) Physical Chemistry of Cells, (tr. Bern Stämpfli) pp. 207 ff, Blackiston, Philadelphia.
- 16 Harkins, W.D. and Anderson, T.F. (1938) J. Biol. Chem. 125, 369.
- 17 Kleinschmidt, A.K. and Zahn, R.K. (1959) Z. Naturforsch. 14b, 770.
- 18 Gorter E. and Grendel, F. (1926) Proc. K. Acad. Amst. 29, 371, 1262.
- 19 Gorter, E. and Maaskant, L. (1937) Proc. K. Acad. Amst. 40, 71, 74.
- 20 Gorter, E. (1938) The Chemistry of Amino Acids and Proteins (Schmidt, C.L.A. ed.), Thomas, Springfield, IL.
- 21 Williams, R.C. and Wyckoff, R.W.G. (1944) J. Appl. Phys. 15, 712; Kleinschmidt, A.K. and Zahn, R.K. (1958) Proc. First Int. Congr. Electron Microsc., Berlin, Vol. 2, O 8.

Correspondence: A-K. Kleinschmidt, Institut für Mikrobiologie der Universität Ulm, Postfach 4066, D-7900 Ulm (Donau), F.R.G.

BBA 8173

DARSTELLUNG UND LÄNGENMESSUNGEN DES GESAMTEN DESOXYRIBONUCLEINSÄURE-INHALTES VON T₂-BAKTERIOPHAGEN

ALBRECHT K. KLEINSCHMIDT, DIMITRIJ LANG,
DIETHER JACHERTS UND RUDOLF K. ZAHN

*Hygiene-Institut, Institut für Therapeutische Biochemie und
Institut für Vegetative Physiologie, Universität Frankfurt am Main (Deutschland)*

(Eingegangen am 1. Juni, 1962)

SUMMARY

Preparation and length measurements of the total deoxyribonucleic acid content of T₂ bacteriophages

Electron micrographs of DNA macromolecules are prepared by spreading a suitable protein-salt solution with T₂ phages to a mixed monolayer on a water-air interface. During the development of the film an osmotic shock occurs which confines the whole DNA content as a single thread near the phage ghost. The surface film is transferred to the support (carbonized formvar) by adsorption and removal of the water. The contrast arises by platinum deposition during the rotation of the specimens in a shadow-casting chamber. With a frequency of about 30 %, unequivocal measurements of the DNA-thread system are possible. The first data of an average T₂-DNA length of $49 \pm 4 \mu$ are discussed in relation to the possible sources of error.

EINLEITUNG

Bei Versuchen, mittels optischer Darstellung der DNA einzelner Bakteriophagen über die Länge und damit über die Molekulargewichte Aufschluss zu erhalten, wurden verschiedene Wege eingeschlagen. Sowohl der mikroskopische Nachweis der Zerfälle radioaktiv-markierter Phagen-DNA (mit [³H]Thymin¹; mit [³²P]DNA^{2,3}) wie die direkte elektronenmikroskopische Darstellung von Phagen-DNA nach Beschattung mit Schwermetallen⁴ erfordert die Isolierung der DNA aus den Phagenköpfen mit möglichst schonenden Methoden. Meist wird dazu die Phenolextraktion nach GIERER UND SCHRAMM^{5,6} angewendet. Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse über Bakteriophagen (vgl. ADAMS⁷, KELLENBERGER⁸) hat man ein Phagenom zu erwarten, dessen Länge den Durchmesser des Phagenkopfes um mehr als das Hundertfache übertrifft. Deshalb können die bei jeder Präparation möglichen Strömungsgradienten hohe Scherkräfte an den Makromolekülen erzeugen und durch Querbrüche gegenüber dem natürlichen Zustand zu kurze Stücke vortäuschen⁹.

Zur individuellen Längenbestimmung des gesamten DNA-Inhaltes erscheint es vorteilhaft, diesen unmittelbar nach Austritt aus dem Phagenkopf und nach selbsttätiger Auflockerung der ursprünglich dichten Packung räumlich neben der leeren

Hülle ohne Zufuhr äusserer Kräfte zu fixieren. Das ist durchführbar, wenn man die Phagen osmotisch schockt¹⁰ und die elektronenmikroskopische Darstellung gleich anschliesst. Versuche dieser Art wurden zum ersten Mal von WILLIAMS UND FRASER¹¹⁻¹³ an T₂-Phagen publiziert. Dabei fand der osmotische Schock an Virusteilchen statt, die zunächst an der Träger-(Kohle-)Folie adsorbiert waren und dann ihren DNA-Inhalt an die unmittelbare Umgebung teilweise freigaben.

In der vorliegenden Untersuchung werden die Methoden der Spreitung von DNA-Molekülen mit einem filmbildenden Protein¹⁴ kombiniert mit dem osmotischen Schock, ähnlich wie bei der Darstellung der DNA von Bakterienprotoplasten¹⁵. Man erhält damit elektronenmikroskopische Aufnahmen intakter Phagen-DNA, die für eindeutige Längenmessungen brauchbar sind.

EXPERIMENTELLES

1. Phagen-Suspension

T₂-Phagen (Wildtyp)* werden durch Infektion von *E. coli* B in der exponentiellen Wachstumsphase mit der Multiplizität 5 in flüssigem belüftetem Medium (15 g Nutrient Broth, 15 g Yeast Extract (Difco), 17 g Glucose ad 1000 ml *aqua dest.*) bei 37° gezüchtet. Nach der Lyse wird die Suspension durch Zentrifugieren bei etwa 6000 × g von grösseren Zelltrümmern befreit und zweimal in der Ultrazentrifuge bei 100 000 × g gewaschen. Hier kann zur Entfernung extrazellulärer DNA eine Behandlung mit DNAase I eingeschaltet werden (5 µg/ml, Worthington, 10 Min). Das Sediment wird jeweils in Phagenpuffer (4 g NaCl, 3 g KH₂PO₄, 7 g Na₂HPO₄ · 2H₂O, 2 ml einer 10 % MgSO₄-Lösung, *aqua dest. ad* 1000 ml) aufgenommen. Die Stammsuspension wird bei 4° gelagert, der Titer im Plattentest bestimmt.

2. Spreitung mit osmotischem Schock

Die Phagen-Suspension wird verdünnt und mit der zur Filmbildung vorbereiteten Lösung versetzt. Diese enthält dann (bei pH 7): etwa 5 · 10⁹ Phagen/ml, 2 M Ammoniumacetat (p.a., Fa. E. Merck und Co.), 0,01 % Cytochrom *c* (Fa. Mack, Illertissen) und 0,05 % Isopropanol. Die Konzentration des Alkohols wurde nach Vorversuchen —entsprechend dem Vorgehen von STÄLLBERG UND TEORELL^{16,17}— als geeignet für die Filmbildung gefunden, wenn kurz vor der Spreitung zugesetzt wird. Dann ist die denaturierende Wirkung des Alkohols gering (vgl. Ref. 18). Der Film wird auf doppelt destilliertem Wasser als Substrat (Hypophase) so erzeugt, dass osmotischer Schock und Spreitung mit Adsorption am Proteinfilm etwa gleichzeitig stattfinden. Dies kann in einer flachen paraffinierten Glasschale¹⁹ oder in einem Kunststoffrog¹⁴ (PVC, Fa F. Kniese, Marburg/Lahn) geschehen. Die für eine vollständige Filmbildung erforderliche Ablaufvorrichtung war eine hydrophile schwach geneigte Rampe (Glasobjektträger) oder ein vertikal in das Substrat eintauchender Glasstab (TRURNIT²⁰, vgl. Ref. 21); Auslaufmenge mindestens 0,1 ml. Die Filmgrenzen kann man durch vorher aufgestreutes Talcum markieren, mit einer paraffinierten Barriere werden Kompression und Dekompression vorgenommen.

* Vom Institut für Mikrobiologie, Universität Frankfurt am Main, (Direktor: Professor Dr. R. W. KAPLAN) dankenswerterweise erhalten.

3. Übertragung auf elektronenmikroskopische Trägerfolien

Der Film wird nach völliger Ausbreitung geringfügig komprimiert, so dass keine unbesetzten Stellen auftreten. Man bringt ihn dann in Kontakt mit der horizontal gehaltenen Folie aus Formvar+Kohle. Diese ist auf eine Platinobjektblende (Pt/Au, 2.4 mm Durchmesser, 0.9 mm Höhe, zum Elmiskop I) mit sieben Bohrungen von je 70 μ Durchmesser montiert. Nach Filmadsorption wird die Blende abgehoben und der daran hängende Tropfen des Substrates durch seitliches Absaugen mit Filterpapier oder mit der "Isopentan-Methode" (nach PETERS, vgl. Ref. 22) entfernt. Beide Präparationswege liefern hier praktisch gleiche Resultate. Bei der Anwendung von Aethanol und Isopentan sind zuweilen kleine runde kontrastreiche Verunreinigungen unbekannter Herkunft im Film nach der Bedampfung sichtbar (vergleiche Ref. 23).

4. Bedampfung

Für die lückenlose Darstellung der DNA-Fäden ist eine Kegelbedampfung mit optimalen Kontrast erforderlich: Von einem regelbar elektrisch aufgeheizten Wolframdraht (0.7 mm Durchmesser, 6 cm lang) wird bei einem Vakuum besser als $5 \cdot 10^{-5}$ torr ein 4.5-cm langer Platin-Iridium-Draht (80:20) von 0.1 mm Durchmesser innerhalb von 1 Min verdampft; Abstand Objekt-Bedampfungsquelle 13 cm, flacher Bedampfungswinkel von 6 bis 10 Grad. Die Objektblenden rotieren mittels eines motorgetriebenen tellerförmigen Halters in der Bedampfungsapparatur (Fa. Siemens und Halske AG, Typ 350a) mit 40 Umdr./Min. Der Bedampfungsvorgang wird direkt beobachtet: Schmelzen des aufgewickelten Pt-Drahtes, Verdampfen des beweglichen flüssigen Platintropfens und Durchbrennen des Wolframdrahtes am Schluss. Wenn die Bedampfung unmittelbar der Spreitung folgt, sind die Präparate mindestens einige Wochen haltbar.

5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Es wird mit dem Elmiskop I (Fa. Siemens und Halske AG) abgebildet: 80 kV, Kondensor I und II mit 200- μ Blende, Objektiv mit 50- μ Blende, Projektiv mit Polschuh 1, Perutz-Kontrast-Platten 6.5 $\times$ 9 cm. Bei der Durchmusterung einer Objektblende, die im adsorbierten Proteinfilm osmotisch geschockte bedampfte Phagen enthält, geht man von den leicht erkennbaren Phagenhüllen aus und verfolgt mit der Leuchtschirmlupe (10-fach) den Fadenverlauf. Danach wird das Bild so in die Mitte gestellt, dass die gesamte Fadenanordnung auf den Mittelbereich von 6 $\times$ 8 cm kommt, was bei 8000-facher Vergrößerung in der Regel möglich ist. Nur in seltenen Fällen sind vier (oder mehr) sich überlappende Aufnahmen erforderlich, um den DNA-Faden vollständig zu erfassen. Bei niedrigeren Vergrößerungen sind die DNA-Fäden auf dem Leuchtschirm meist nicht mehr sicher zu erkennen.

Zur Vergrößerungsbestimmung wurde im Lichtmikroskop mit geeichtem Okularmikrometer eine 7-Lochblende mit perforierter Kohle-Kollodiumfolie vermesen und als Masstab im Elektronenmikroskop durch das Objektiv allein und kombiniert mit der Zwischenlinse mit und ohne Projektiv photographiert. Dabei ist noch eine kissenförmige Verzeichnung in der Bildebene zu berücksichtigen, die je nach Ausdehnung des Objektes die Endvergrößerung um maximal 6 % (in der Peripherie

der Platte) erhöht. Meist wurde als zusätzliche Kontrolle das Mittelloch der Objektblenden ($70\ \mu$ Durchmesser) bei geringer Vergrößerung photographiert und dann im Lichtmikroskop ausgemessen.

6. Längenmessungen

Nach verschiedenen Versuchen, die Längenmessungen für eine grössere Fadenzahl praktikabel und genügend genau einzurichten, benutzen wir jetzt folgende Methode: Nachdem der Vergrößerungsstab auf dem Negativ festgelegt ist, wird das DNA-Bild mit einem Projektor (z.B. Leitz-Hochleistungs-Diaskop IVb L) auf eine mit weissem Papier bespannte Wand bei etwa 18-facher Vergrößerung abgebildet, wobei nur der mittlere Bereich des Formates ausgenutzt wird. Der DNA-Faden wird einschliesslich des dazugehörigen Phagen abgezeichnet und die entstandene Figur in einem zweiten Arbeitsgang auf dem Zeichentisch nachgefahren. Der dazu benutzte Kurvenmesser ergibt bei einer Umdrehung des Zeigers (2 cm lang) 100 Skalenteile = 100 cm Kurvenlänge.

7. Fehler der Längenmessung

(a) Aufnahmen, die wegen unvollständiger Ausbreitung der DNA oder Überlagerung von DNA aus verschiedenen Phagen keine eindeutige Längenmessung zulassen, werden möglichst ausgeschlossen.

(b) Der Fehler der Vergrößerung kann aus dem Bestimmungsverfahren abgeschätzt werden und ist etwa 3 % (vgl. RUSKA UND WOLFF²⁴).

(c) Die radiale Verzeichnung des Endbildes ist bei den DNA-Aufnahmen mit der Fadenmitte im Zentrum im Mittel etwa +2 % (geschätzt, vgl. Abschnitt 5). Die gemessenen Längen werden daher mit dem Korrektionsfaktor 1.02 multipliziert.

(d) Die Phagen-DNA ist meist in Schlaufen um ein oder selten mehrere Zentren angeordnet. Wenn dieses von der Phagenhülle verdeckt ist, wird zur gemessenen Länge der Betrag $z \cdot r$ addiert wobei r der mittlere Radius der Phagenhülle (Kopf) und z die Zahl der ein- und auslaufenden DNA-Fäden bedeuten.

(e) Der Betrag eines möglichen Fehlers durch abdiffundierte DNA-Bruchstücke ist von uns bisher nicht ermittelt worden. Er scheint jedoch klein zu sein, da die Häufigkeit, mit der mehr als zwei freie Enden pro Phage sichtbar sind, vernachlässigbar ist.

(f) Die Möglichkeit einer Längsstreckung oder -schrumpfung der DNA bei osmotischem Schock und Filmdesorption bedarf noch der weiteren Untersuchung.

(g) Der Fehler des Kurvenmessers ist höchstens ± 0.5 cm. Das sind gegenüber einer mittleren Messlänge von 681 cm ± 0.08 %.

(h) Tabelle I zeigt die ersten Messungen für eine Längenverteilung. Jede Aufnahme wurde von zwei Beobachtern gemessen. Die Abweichungen zwischen den Beobachtern (7. Spalte) sind zufälliger Art, denn ihre Summe ist $\Sigma \varepsilon = +0.5$ cm, also klein gegen die Summe der Beträge $\Sigma |\varepsilon| = 25.3$ cm. Daher ist eine Mittelwertbildung aus den jeweils zwei Messungen sinnvoll (8. Spalte). Die mittlere Abweichung von diesen Mittelwerten ist dann $\frac{1}{2} \sqrt{\Sigma \varepsilon^2 / (n-1)} = \pm 0.7$ %, wenn $n = 19$ die Anzahl der ausgemessenen Aufnahmen ist.

(i) Die geometrische Summe der zufälligen Fehler, die nur durch das Längenmessverfahren gegeben sind (Vergrößerung, Verzeichnung, Reproduzierbarkeit mit dem Kurvenmesser und subjektive Messfehler) ist.

$$\sqrt{3^2 + 1^2 + 0.08^2 + 0.7^2} = \pm 3.2 \%$$

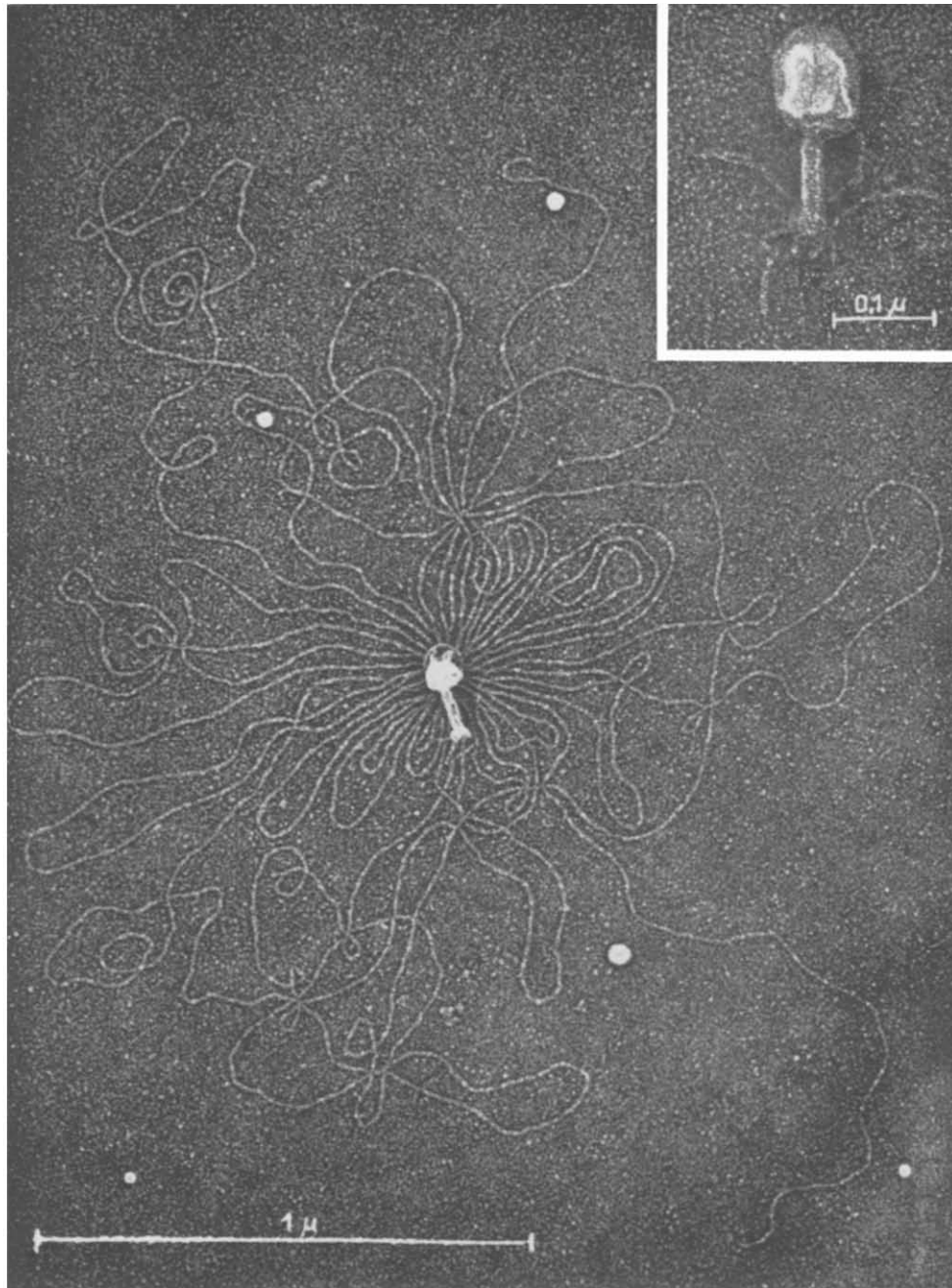


Abb. 1. DNA von T₂-Phagen, nach osmotischem Schock und Spreitung. Ausgebreiteter DNA-Faden mit 2 Enden, im Zentrum Phagenhülle. Präparation siehe Text, Isopentanmethode. $\times 64\,000$. (No. 8066). Oben rechts: T₂-Phage, nicht osmotisch geschockt, (auf 0,1 % Formaldehyd-lösung gespreitet), $\times 125\,000$. Pt-Kegelbedampfung, Negativbild.

RESULTATE

Die Betrachtung vieler Bilder osmotisch geschockter Phagen (Beispiel: Abb. 1) im Vergleich zu nicht geschockten (Spreitung einer gleichen Suspension ohne Isopropanol und ohne hohen Salzgehalt auf 0.1 % Formaldehydlösung als Hypophase) zeigt, dass der Phagenkopf meist im oberen Drittel aufgerissen und entleert ist. Die Umhüllung des Schwanzes (Scheide und Fibrillen, vgl. Ref. 8 und Ref. 25) ist oft nicht sichtbar. Der gesamte DNA-Inhalt erscheint als ein Einzelfaden von gleichmässiger Dicke, der meist in zahlreichen Schlaufen (im Mittel 18) um ein Zentrum angeordnet ist, das oft verdeckt in der Phagenhülle oder nahe daneben liegt. In der Regel sind zwei freie Enden erkennbar, gelegentlich auch nur eines, die sich meist im äusseren Drittel des Fadensystems befinden. Man kann aus der Vielzahl der Bilder schliessen, dass diese Methode die Phagen-DNA intakt lässt. Das ist auch zu erwarten, weil die DNA unmittelbar nach der Entleerung aus dem Phagenkopf durch Adsorption mechanisch am Cytochrom *c*-Film fixiert wird, bevor sie sich ganz zu einem statistischen Knäuel ausgebreitet hat. Wenn ausserdem Strömungen in der Lösung beim Spreiten klein gehalten werden (langsames Einfließen), ist die DNA-Bruchwahrscheinlichkeit (vgl. BURGI UND HERSHEY²⁶) sehr klein.

Die Ausbeute an ausmessbaren DNA-Fäden war bei dieser Reihe nach grober Schätzung etwa 30 %. Aus der Tabelle I folgt, dass die mittlere DNA-Länge pro Phage etwa $49 \pm 4 \mu$ beträgt. Zur Berechnung des Molekulargewichtes aus der Länge muss die DNA-Struktur bekannt sein. Bei Annahme der B-Konfiguration zwei-

TABELLE I
LÄNGEN UND MOLEKULAR-GEWICHTE VON T₂-PHAGEN

Aufnahme No.	Vergrößerung			DNA-Länge pro Phage						Mol. Gew.
	Elektronen Optik	Projektor	Gesamt (10 ⁵)	Gemessen von Beobachtern		Abweichung $\epsilon = \frac{A-B}{A}$ (%)	Mittelwert A, B (cm)	Korrigiert nach 7c und 7d (cm)	Dividiert durch Gesamtvergrößerung (μ)	Na-DNA von T ₂ (10 ⁶)
				A (cm)	B					
8066	8260	17.70	1.462	629	636	-1.1	632	670	45.8	95
8077	8050	17.70	1.423	613	597	+2.4	607	638	44.8	93
8078	8050	17.70	1.423	671	662	+1.3	666	695	48.8	102
8079	8050	17.70	1.423	663	671	-1.1	667	703	49.4	103
8080	8220	17.72	1.458	700	700	±0.0	700	734	50.3	105
8081	8220	17.72	1.458	740	750	-1.4	745	785	53.9	112
8082	8220	17.72	1.458	584	596	-2.1	590	624	42.8	89
8084a	8220	17.72	1.458	825	828	-0.4	826	853	58.5	122
8084b	8220	17.72	1.458	753	753	±0.0	753	782	53.6	112
8085	8220	17.72	1.458	672	654	+2.7	663	703	48.2	100
8090	8220	17.72	1.458	666	662	+0.6	664	693	47.6	99
8091	8220	17.72	1.458	652	646	+0.9	649	691	47.4	99
8092	8220	17.72	1.458	796	779	+2.1	788	811	55.6	116
8148	8220	17.72	1.458	617	621	-0.6	619	647	44.4	92
8156	8220	17.72	1.458	629	628	+0.2	628	666	45.7	95
8158	8220	17.72	1.458	717	743	-3.6	730	781	53.6	112
8159	8220	17.72	1.458	654	668	-2.1	661	706	48.5	101
8160	8220	17.72	1.458	659	645	+2.1	652	682	46.8	97
8161	8220	17.72	1.458	700	696	+0.6	698	737	50.6	105
Mittelwerte:									49.3	103

strängiger DNA (WATSON UND CRICK²⁷), einem molaren Basenverhältnis $([A] + [T]) / ([G] + [HMC]) = 1.93$ (vgl. Ref. 7, Mittelwert aus den Angaben der Tabelle X. A, Adenin; T, Thymin; G, Guanin; HMC, 5-Hydroxymethylcytosin) und einem molaren Glucosegehalt des HMC von 0.13/0.17 (vgl. Ref. 28, Tabelle II, S. 201) ergibt sich der Wert $2.08 \cdot 10^6$ als Molekulargewicht pro 1μ Na-DNA. Die hiermit berechneten Na-DNA-Molekulargewichte pro Phage (11. Spalte, Tabelle I) haben den Mittelwert von $103 \cdot 10^6$. Die Streuung der Längen um den Mittelwert ($\pm 8.6 \%$) ist grösser als der durch das Messverfahren allein bedingte mittlere Fehler der Einzelmessung ($\pm 3.2 \%$). Daher scheinen individuelle Unterschiede zwischen den DNA-Längen von T₂-Phagen zu bestehen. Zur Bestätigung dieses Befundes ist eine genauere Bestimmung der DNA-Längenverteilung erforderlich; diese Messungen mit der hier beschriebenen Methode sind im Gange.

DANK

Wir danken Herrn PROFESSOR DR. K. HERZBERG für seine grosszügige Unterstützung, Frau C. PLESCHER, Fräulein W. HELLMANN und Fräulein J. HAASS für vorzügliche technische Mitarbeit.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine salzhaltige Proteinlösung mit suspendierten T₂-Phagen wird auf einer Grenzfläche Wasser–Luft zu einem Mischfilm gespreitet und elektronenmikroskopisch untersucht. Während der Filmbildung wird der DNA-Inhalt der Phagen durch osmotischen Schock freigesetzt und liegt jeweils als Einzelfaden in der Nähe der Phagenhülle. Der Oberflächenfilm wird auf Objektblenden (mit Kohle-Formvar-Folie) durch Adsorption übertragen und getrocknet. Die Kontrastierung erfolgt durch Kegelbedampfung mit Platin in einer Vakuumkammer. Etwa 30 % der elektronenmikroskopischen Bilder lassen eindeutige Längenmessungen der DNA-Fäden zu. Die ersten Messwerte, welche eine mittlere DNA-Länge von $49 \pm 4 \mu$ ergaben, werden in Beziehung zu möglichen Fehlerquellen diskutiert.

LITERATUR

- ¹ J. CAIRNS, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 756.
- ² P. E. DAVISON, D. FREIFELDER, R. HEDE UND C. LEVINthal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47 (1961) 1129.
- ³ I. RUBENSTEIN, C. A. THOMAS, JR. UND A. D. HERSHEY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47 (1961) 1113.
- ⁴ M. BEER, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 263.
- ⁵ A. GIERER UND G. SCHRAMM, *Z. Naturforschg.*, 11b (1956) 138.
- ⁶ J. D. MANDELL UND A. D. HERSHEY, *Anal. Biochem.*, 1 (1961) 66.
- ⁷ M. H. ADAMS, *Bacteriophages*, Interscience, New York, 1959.
- ⁸ E. KELLENBERGER, *Adv. in Virus Research*, 8 (1962) 1.
- ⁹ C. LEVINthal UND P. F. DAVISON, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 674.
- ¹⁰ T. F. ANDERSON, *J. appl. Physics*, 21 (1950) 70.
- ¹¹ R. C. WILLIAMS, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 18 (1953) 185.
- ¹² D. FRASER UND R. C. WILLIAMS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 39 (1953) 750.
- ¹³ R. C. WILLIAMS UND D. FRASER, *Virology*, 2 (1956) 289.
- ¹⁴ A. KLEINSCHMIDT UND R. K. ZAHN, *Z. Naturforschg.*, 14b (1959) 770.
- ¹⁵ A. KLEINSCHMIDT, D. LANG UND R. K. ZAHN, *Z. Naturforschg.*, 16b (1961) 730.
- ¹⁶ S. STÄLLBERG UND T. TEORELL, *Trans. Faraday Soc.*, 35 (1939) 1413.
- ¹⁷ F. MACRITCHIE UND A. E. ALEXANDER, *J. Colloid Sci.*, 16 (1961) 57.

Biochim. Biophys. Acta, 61 (1962) 857–864

- ¹⁸ D. F. CHEESMAN UND J. T. DAVIES, *Adv. Protein Chem.*, 9 (1954) 439.
- ¹⁹ A. KLEINSCHMIDT, *Kolloid-Z.*, 142 (1955) 74.
- ²⁰ H. J. TRURNIT, *J. Colloid Sci.*, 15 (1960) 1.
- ²¹ H. SOBOTKA UND H. J. TRURNIT, in P. ALEXANDER UND R. J. BLOCK, *Analytical Methods of Protein Chemistry*, Band III, Oxford Pergamon Press, 1961, S. 211.
- ²² A. KLEINSCHMIDT UND R. K. ZAHN, *IV. Internat. Kongr. Elektronenmikroskopie, Berlin, 1958*, Band II, Springer-Verlag, Berlin, 1960, S. 115.
- ²³ A. KLEINSCHMIDT, M. GEHATIA UND R. K. ZAHN, *Kolloid-Z.*, 169 (1960) 156.
- ²⁴ E. RUSKA UND O. WOLFF, *Z. wiss. Mikroskopie*, 62 (1956) 465.
- ²⁵ R. W. HORNE UND P. WILDY, *Virology*, 15 (1961) 348.
- ²⁶ E. BURGI UND A. D. HERSHEY, *J. Mol. Biol.*, 4 (1962) 313.
- ²⁷ J. D. WATSON UND F. H. C. CRICK, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 18 (1953) 123.
- ²⁸ R. L. SINSHEIMER, *The Nucleic Acids*, Band III, Academic Press, 1960, S. 187.

Biochim. Biophys. Acta, 61 (1962) 857-864