

matography is carried out with sodium chloride solutions. Details see legend to Figure 4.

**Results.** As can be seen from Figures 1, 3, and 4, PEI-cellulose TLC offers considerable advantages as compared with DEAE-cellulose TLC and with DEAE-paper chromatography. The PEI-cellulose layer gave sharply delineated spots, whereas the spots on the DEAE-cellulose layers are more diffuse. The least satisfactory results are obtained with DEAE-paper. The sensitivity decreases in the order: PEI-cellulose layer, DEAE-cellulose layer, DEAE-paper, being for the latter at least ten times smaller than for PEI-cellulose. Radioactive labeling of the compounds will of course further increase the sensitivity of the PEI-cellulose technique. The anion-exchange procedures have, as compared with partition chromatography of oligonucleotides<sup>12</sup>, the additional advantage of requiring a minimum of time. As it seems to us, an important feature of the method is the remarkable mechanical stability of the PEI-cellulose layer which permits writing on it like on a sheet of paper. Moreover, the nitrogen content of the impregnated cellulose can be varied over a relatively wide range so that the chromatographic conditions can be adapted to the analytic requirements.

In the case of the impregnated PEI-cellulose there is apparently a principal difference as compared to the substituted DEAE-cellulose. Compounds with free phosphomonoester groups are on PEI-cellulose, in contrast to DEAE-cellulose, more retarded than can be predicted from the net charge of the molecule (Figure 2). For ex-

ample, compare TpTpTpTpT (No. 10) with (pT)<sub>3</sub> (No. 3), both having a net charge of four, or (pT)<sub>1</sub> (No. 1) with TpTpT (No. 8), both having a net charge of two. Base differentiation between adenine and thymine derivatives of the same type is also observed on PEI-cellulose (see Figure 1: (pT)<sub>3</sub> and (pdA)<sub>3</sub>).

The results make it clear that PEI-cellulose TLC may be a valuable analytical tool in nucleic acid chemistry. The possibility of applying this method in column chromatography is under current investigation<sup>13</sup>.

**Zusammenfassung.** In der vorliegenden Untersuchung wird gezeigt, dass Dünnschichtchromatographie von Desoxyribo-oligonucleotiden an Cellulose, welche zuvor mit Polyäthylenimin imprägniert worden war, hinsichtlich Empfindlichkeit und Schnelligkeit der Trennung den bisher bekannten Methoden überlegen ist.

G. WEIMANN and K. RANDERATH

*Institut für organische Chemie, Technische Hochschule, Darmstadt (Germany), October 11, 1962.*

<sup>12</sup> G. WEIMANN and H. G. KIIRANA, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 419 (1962).

<sup>13</sup> **Acknowledgment.** We wish to thank Professor F. CRAMER for his interest in this work.

### Strip-Transfer Method Applicable in Two-Dimensional Paper Chromatography

Normally the two separations in two-dimensional paper chromatography are carried out on one sheet of filter paper. Only a rather narrow strip, however, is necessary in the first development, whereas the rest of the paper can be omitted. It should be possible, therefore, to start with one-dimensional chromatography on a strip of filter paper. Then the developed chromatogram can be extended in two opposite directions with rectangular sheets of filter paper of appropriate size. One sheet serves to absorb the solvent in the second separation, which separation is carried out perpendicular to the one-dimensional direction in the second sheet.

Advantages of this method are: (1) It allows the use of smaller chromatography boxes than those usually applied in two-dimensional chromatography. (2) A considerable decrease of the amount of solvent necessary in the first separation. (3) The possibility of carrying out both separations in the same fibre direction of the paper. (4) A one-dimensional separation by paper electrophoresis can be combined with a second separation by means of paper chromatography in a direction perpendicular to the first one. (5) The possible influence of the solvent from the first run on the second separation will be decreased, since only a small part of the two-dimensional chromatogram has been in contact with the first solvent. (6) Two different types of filter paper can be used for the two subsequent separations.

Methods for attaching segments of a chromatogram to another sheet of filter paper have been described mainly in one-dimensional chromatography, e.g. by sewing<sup>1,2</sup>, or by pressing between a folded sheet<sup>3</sup>, or by inserting into a rectangular hole<sup>4</sup>. These methods, however, are rather

laborious. SCHLÖGL and SIEGEL<sup>5</sup> have pressed segments of one-dimensional chromatograms to sheets of filter paper by means of two glass plates covering the segments totally. This method can also be applied in a subsequent two-dimensional separation of a one-dimensional chromatogram. The procedure, however, did not appear to be generally applicable, as will be shown below.

We have developed the following method: A segment of a one-dimensional paper chromatogram or an electropherogram of 26 × 2.5 cm containing the larger part of the compounds separated is attached to two sheets of filter paper by means of two pairs of glass bars as shown in Figure 1. We used a wooden planchet provided with a groove having the same form as the glass bar, see Figure 2. After first putting one bar in this groove one of the sheets is put upon the bar with its appropriate edge, covering about 4 mm of this bar. Subsequently the other sheet is placed in the opposite direction covering the first sheet over a length of about 3 mm. Finally the two papers are pressed together by a second bar and clamped by two clamps, see Figure 3. One can make use of weights to prevent the sheets moving from their positions during handling. The method has been tested both with Whatman No. 1 and with Whatman No. 541 filter paper. The resulting chromatograms were comparable with normal two-dimensional chromatograms. The compounds however, are not removed quantitatively from the strip, if the edges of the sheets are not completely covered by the bars.

<sup>1</sup> L. A. BOGGS, *Anal. Chem.* **24**, 1673 (1952).

<sup>2</sup> A. STÜCKLI, *Helv. chim. Acta* **37**, 1581 (1954).

<sup>3</sup> U. S. VON EULER and R. ELIASSON, *Nature* **170**, 804 (1952).

<sup>4</sup> G. W. F. H. BORST-PAUWELS, *Thesis Leiden* (1950) (Dutch language).

<sup>5</sup> K. SCHLÖGL and A. SIEGEL, *Z. physiol. Chem.* **292**, 263 (1953).

We have compared our method with the technique of SCHLÖGL and SIEGEL. Two one-dimensional electropherograms of radioactive phosphorus compounds (originating from yeast suspended in a medium containing radioactive orthophosphate) were made on strips of Whatman No. 541  $34 \times 2.5$  cm during 5 h at 7 V/cm. The buffer used was 0.025M sodium citrate pH 3.5. Then a segment of  $26 \times 2.5$  cm was cut from each electropherogram. According to the method of SCHLÖGL and SIEGEL, one segment was placed upon a sheet of Whatman No. 541 of  $26 \times 46$  cm at a distance of 10 cm from the upper edge. Two glass plates of  $27 \times 3$  cm and 3 mm thick pressed the strip against the sheet. The plates were held

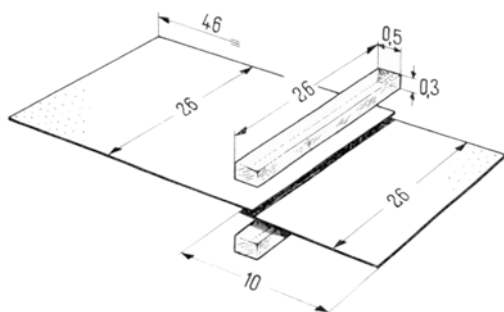


Fig. 1. Clamping two sheets of filter paper between the glass bars. All dimensions are given in cm; this applies also to Figure 2.

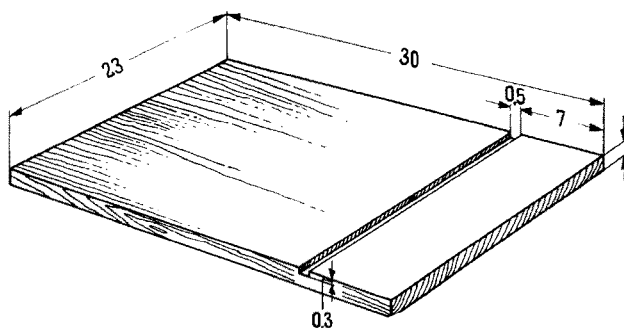


Fig. 2. Wooden planchet for holding the bars in position.

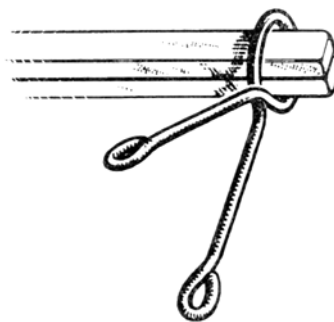
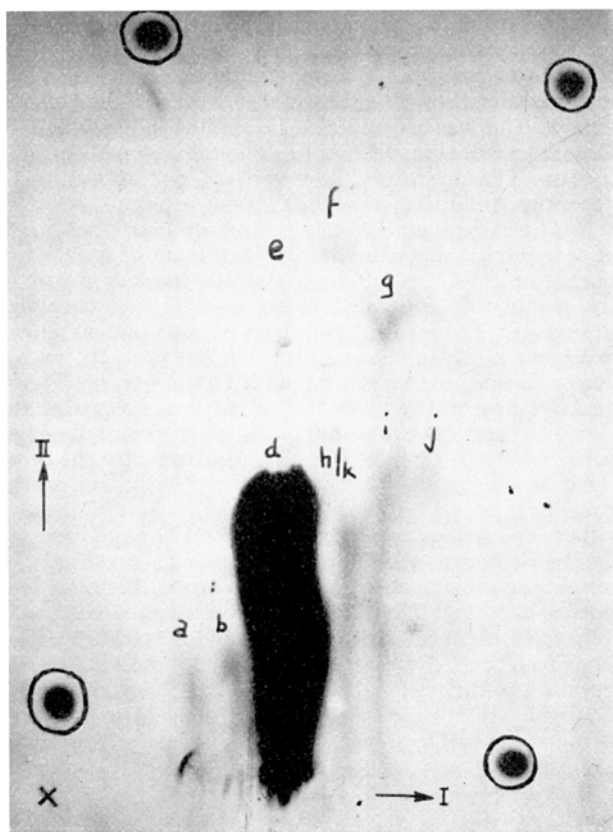
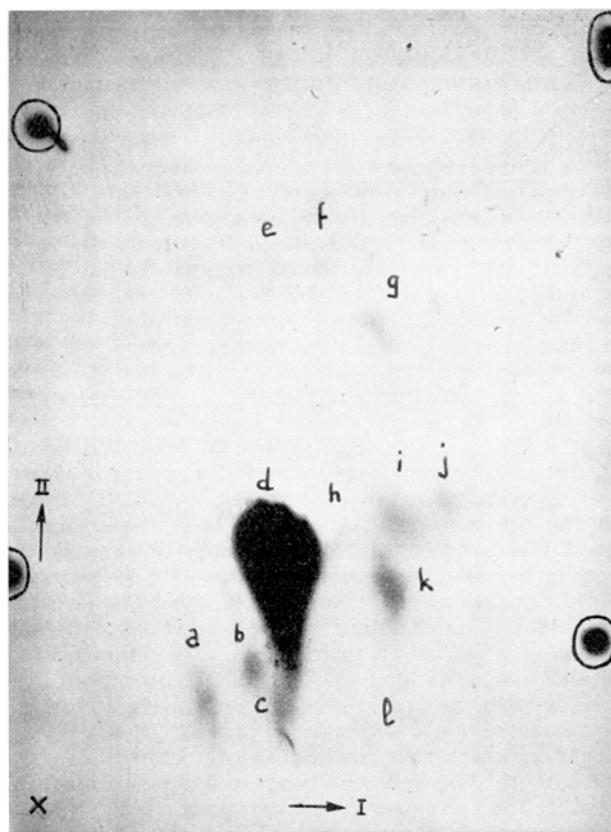


Fig. 3. Design of the metal clamps.



a



b

Fig. 4. Comparison of autoradiograms from chromatograms developed respectively according to SCHLÖGL and SIEGEL (a) and following the method described in this paper (b). We refer to the text for details. The encircled spots originate from radioactive ink marks.

in position by means of rubber bands. Another segment was attached to two sheets of Whatman No. 541 following the method outlined above. The second separation was carried out with the solvent-system propanol : ammonia : water = 60 : 40 : 10 and 0.1% versene in the descending direction during 40 h. The solvent was run from the paper into an absorbent pad of common filter paper attached at 36 cm from the electropherogram. Figure 4 shows the autoradiograms of the chromatograms developed following the two techniques.

It appears that the method described in this paper led to much more compact spots than the procedure of SCHLÖGL and SIEGEL. Only the separation of compounds with high Rf-values gave results with the latter method comparable to ours.

## COGITATIONES

### Reversible Umsteuerung lichtempfindlicher Systeme bei Pflanzen und Tieren

Wird der Einfluss des Lichtes auf vielzellige Organismen diskutiert, so erwartet man bei den Tieren meist Ausführungen über den Sehvorgang, bei den Pflanzen über die Photosynthese. Es ist weniger bekannt, dass das Licht unabhängig hiervon bei Pflanzen und Tieren einen entscheidenden Einfluss auf eine Vielzahl vegetativer Vorgänge wie das Wachstum, den Stoffwechsel, die Reproduktivität sowie andere Funktionen ausübt. Bei den Pflanzen handelt es sich hierbei um die Erscheinung der Photomorphogenese, womit man die unmittelbare, d.h. von der Photosynthese unabhängige Beeinflussung der pflanzlichen Gestaltung und Differenzierung bezeichnet. Im Mittelpunkt der Betrachtungen zur formativen Lichtwirkung stand früher das kurzwellige Licht, dem allein eine das Längenwachstum beeinflussende Wirkung zuerkannt wurde. Heute wissen wir, dass für die Steuerung des Stoff- und Energiewechsels der pflanzlichen Zelle verschiedene Systeme verantwortlich sind, wobei insbesondere die langwellige Strahlung um 660 m $\mu$  eine Rolle spielt<sup>1</sup>.

Bei den Tieren sind unter den Einflüssen des Lichtes auf vegetative Vorgänge – soweit diese über spezielle lichtempfindliche Organe, d.h. Augen, verlaufen – solche auf das Zwischenhirn-Hypophysensystem besonders bekannt geworden. Dabei ist bei den Amphibien und Fischen der Farbwechsel<sup>2</sup>, bei den Vögeln die Wirkung auf das Wachstum und die Sexualfunktion<sup>3,4</sup> genauer studiert worden. Bei einigen Säugetieren wird ein Einfluss des Lichtes auf die Reifung der Keimdrüsen<sup>5</sup>, beim Menschen auf den Wasserhaushalt<sup>6</sup> und den Kohlehydratstoffwechsel berichtet<sup>7</sup>. Weniger bekannt, doch durch experimentelle Beobachtungen gleichermassen gesichert, ist die Wirkung des Lichtes auf die Epiphyse. Eine grosse Zahl von Amphibien besitzt ein in die äussere Haut vorgelagertes Pinealorgan (Stirnmorgan, «Drittes Auge»), dessen Ausschaltung zu einer Aktivitätsänderung und zu Wirkungen auf den Farbwechsel führt<sup>8</sup>. Die ersten überzeugenden Versuche über die Funktion dieses Organs wurden vor mehr als fünfzig Jahren von von FRISCH durchgeführt<sup>9</sup>; er beobachtete bei Elritzen auf Belichtung eines eng umschriebenen Bezirks in der Scheitelregion einen Farbwechsel, und zwar auch nach Entfernung der lateralen Augen. Über eine ähnliche Wirkung des Lichtes auf die epiphysäre Steuerung vege-

**Zusammenfassung.** Methode zur Befestigung eindimensionaler Papierchromatogramme an anderen Chromatogrammlättern. Dies ermöglicht eine zweite Trennung senkrecht zur ersten Laufrichtung. Die Methode eignet sich auch für eine Kombination von Papierelektrophorese mit Papierchromatographie.

G. W. F. H. BORST-PAUWELS  
and ANNEMARIE DE MOTS

Laboratory for Chemical Cytology, University of Nijmegen (Netherlands), July 25, 1962.

tativer Vorgänge wird bei Eidechsen berichtet, die nach Ausschaltung des Parietalorgans vermehrte Aktivität mit veränderter Periodik und gesteigerter Sexual- und Schilddrüsenaktivität zeigen<sup>10,11</sup>.

Für die photochemische Wirkung des Lichts, die von der Anzahl der im System absorbierten Quanten bestimmt wird, sind bei Pflanzen und Tieren bestimmte photolabile organische Stoffe, die Chromoproteide, verantwortlich. Von diesen am genauesten untersucht ist das in der tierischen Netzhaut nachgewiesene Retinin (die Farbstoff-Komponente des Sehpurpurs), das ein Oxydationsprodukt des Vitamins A darstellt und im tierischen Organismus aus pflanzlichen Carotinen gebildet wird. Auf den Sehpurpur auftreffende Lichtquanten führen bei Absorption zu chemischen Veränderungen. Als erstes entsteht dabei ein orangefarbenes Produkt, das wegen seiner Instabilität als *transient orange* (Sehorange) bezeichnet wird und in Retinin (Sehgelb) übergeht bzw. zu Vitamin A (Sehweiss) gebleicht wird<sup>12</sup>. Während die Bleichung früher als Voraussetzung für die physiologische Wirksamkeit des Lichtes betrachtet wurde, glauben wir heute, dass die unmittelbare Folge der Belichtung in einer Photo-Isomerisation des Farbstoffmoleküls besteht. Hierbei bewirkt das Licht im Falle des Sehpurpurs eine Umlagerung von Doppelbindungen innerhalb des Retininmoleküls aus der *cis*- in die *all-trans*-Konfiguration (Lumi-Rhodopsin, Meta-Rhodopsin), die von einer geringen Verschiebung der Absorptionskurve begleitet ist, und den Zerfall zu Sehgelb (Retinin) und Opsin. Die Resynthese des Sehpurpurs erfolgt im Dunkeln durch eine spontane, d.h. ohne Energiezufuhr ablaufende Verbindung von Retinin und Opsin zu Sehpurpur, jedoch nur dann, wenn das bei der Belichtung entstandene

<sup>1</sup> H. MOHR, *Erg. Biol.* **22**, 67 (1960).

<sup>2</sup> G. H. PARKER, *Animal Colour Changes and their Neurohumours* (University Press, Cambridge 1948).

<sup>3</sup> J. BENOIT, *C. R. Acad. Sci.* **199**, 1671 (1935).

<sup>4</sup> W. M. ROWAN, *Nature* **115**, 494 (1925).

<sup>5</sup> T. A. BISSONETTE, *Quart. Rev. Biol.* **8**, 201 (1933).

<sup>6</sup> F. HOLLWICH, v. Graefes Arch. **149**, 592 (1949).

<sup>7</sup> F. HOLLWICH, v. Graefes Arch. **150**, 529 (1950).

<sup>8</sup> W. M. ADKINS, *Natural History* **70**, 72 (1961).

<sup>9</sup> K. VON FRISCH, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **138**, 319 (1911).

<sup>10</sup> H. J. CLAUSEN und E. G. PORIS, *Anat. Rec.* **69**, 39 (1937).

<sup>11</sup> R. C. STEBBINS und R. M. EAKIN, *Amer. Mus. Novitates*, No. 1870 (1958).

<sup>12</sup> G. WALD, in *Handbook of Physiology* (Amer. Physiol. Soc., Washington 1959), Section 1, vol. I, p. 671.