

deoxyguanylic acid bound in the DNA molecule is responsible⁷⁻⁹.

The course of heat denaturation of DNA's mentioned above has been followed quantitatively, because the anodic indentation becomes deeper by denaturation⁸⁻⁹. The increasing depth of the anodic indentation was then plotted as a function of temperature of the DNA solution (Figures 2 and 3, curve 1). The heat denaturation of DNA samples after 60 min of the UV-irradiation followed, using the same method. The steep portion of the heat denaturation curves of both DNA's studied were shifted

to a lower temperature after the UV-irradiation as compared with the denaturation curves of non-irradiated samples¹⁰ (Figures 2 and 3, curve 2). Similar changes in the course of the denaturation curves of several bacterial DNA's after the UV-irradiation have been found earlier spectrophotometrically².

UV-light causes photochemical alterations of pyrimidine residues of DNA which weaken the stability of the double-stranded DNA molecule. This effect was followed by a number of techniques² up to the present time. The above results published by us yield further experimental possibilities for the physico-chemical assay of nucleic acids based on the oscillographic estimations¹¹.

Zusammenfassung. Die Denaturationskurven von Desoxyribonukleinsäuren aus Kalbsthymus und *Escherichia coli* wurden mit Hilfe der oszillographischen Polarographie untersucht. Nach UV-Bestrahlung der Nukleinsäuren erfolgte eine Verschiebung des Anstiegbereiches nach niedrigeren Temperaturen.

D. KALÁB

Research Department of Bioveta, n.p., Ivanovice na Hané (Czechoslovakia), March 17, 1964.

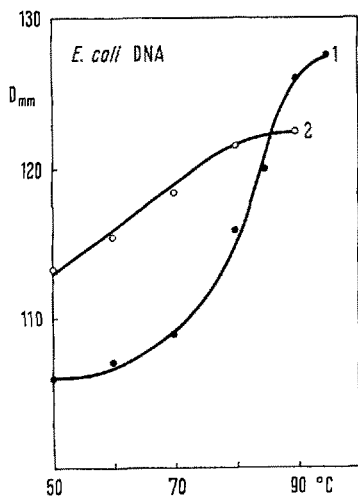


Fig. 3. Heat denaturation curves of *Escherichia coli* B DNA, derived from the oscillographic measurements. Curve 1: DNA before the UV-irradiation. Curve 2: DNA after 60 min of UV-irradiation.

⁷ E. PALEČEK, Nature 188, 656 (1960).

⁸ E. PALEČEK, Biochim. biophys. Acta 51, 1 (1961).

⁹ E. PALEČEK, Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften, in press.

¹⁰ D. KALÁB, (Lecture) Colloquium on oscillographic polarography, Smolenice (Czechoslovakia), September 1963.

¹¹ Acknowledgment. I should like to express my thanks to Dr. E. PALEČEK, from the Biophysical Institute of the Czechoslovak Academy of Sciences, Brno, for kindly providing the deoxyribonucleic acid samples and for valuable discussions.

Dünnschichtstärkelektrophorese

Seit der ersten Veröffentlichung von SMITHIES im Jahre 1955¹ ist die Stärkelektrophorese in jedem biochemischen Labor, hauptsächlich bei der Peptid- und Proteinforschung, zu einem unerlässlichen Hilfsmittel geworden.

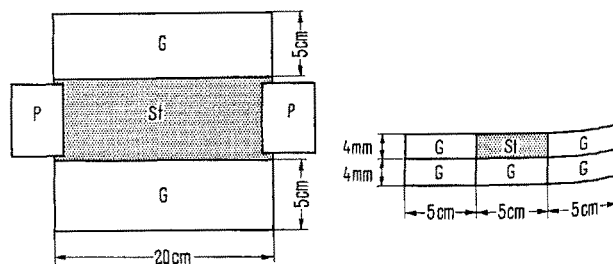
Im folgenden soll eine vereinfachte Modifikation dieser Methode mitgeteilt werden, die darauf beruht, dünne Schichten von Stärke (2–4 mm) auf Glasplatten, die sonst für die Dünnschichtchromatographie benutzt werden, zu verwenden.

Methodik. 7 g Stärke² werden in einem Erlenmeyerkolben in 50 ml des zu benützenden Puffers aufgeschlämmt, rasch unter Schwenken über einer offenen Flamme erhitzt, bis der Brei die von SMITHIES angegebene Dünnpflüssigkeit erreicht hat. Anschließend wird sofort der Erlenmeyerkolben an das Vakuum angeschlossen und durch rasches Schwenken kurz beim Sieden gehalten.

5 Glasplatten 5 × 20 cm werden so gelegt, dass 3 den Boden bilden und 2 auf den beiden äusseren aufliegen (Figur). Der freie Zwischenraum wird nun mit dem Stärkebrei ausgefüllt und schnell mit einem Glasstab an der Oberfläche glattgestrichen. Man kann selbstverständlich an Stelle der beiden Glasplatten, die die Schichtdicke be-

stimmen, entsprechende Schablonen aus Plastik oder anderem Material verwenden.

Sehr kurz nach dem Aufstreichen des Stärkebais auf die Glasplatte, solange die Masse noch weich ist, wird an den



G Glasplatten 4 mm hoch (5 × 20 cm); St Stärkegel; P Papier zur Herstellung des Kontakts zwischen dem Stärkegel und den Puffern in den Kammern.

¹ O. SMITHIES, Biochem. J. 71, 585 (1959).

² Zu beziehen durch SERVA Entwicklungslabor, 69 Heidelberg (Deutschland).

beiden Extremen des Gels je ein Streifen von Filterpapier aufgelegt (wir benutzen Whatman 1), welche den Kontakt mit den Puffern in den Kammern herstellen.

Nach dem Erhalten des Stärkels wird darauf mit einer Rasierklinge ein ca. 4 cm langer Schlitz senkrecht zur Laufrichtung aufgebracht und mittels einer Pipette die Probe gleichmässig aufgetragen (20 λ einer 10prozentigen Proteinlösung). Man kann auch einen Papierstreifen, welcher vorher mit der Probe getränkt wurde, in den Schlitz einlegen. Selbstverständlich muss die Höhe ca. 4 mm sein. (Wir verwendeten z.B. 10 aneinanderliegende Whatman-1-Streifen 4 cm \times 4 mm.) Durch leichtes Drücken des Stärkels von beiden Seiten wird der Schlitz wieder dicht gemacht. Hierbei tritt öfters, hauptsächlich, wenn man die Probe direkt (ohne Papier) einführt, ein Teil wieder heraus. Dieser wird mit einem Filterpapier vorsichtig abgetrocknet.

Die Glasplatte wird genau wie bei der Papierelektrophorese in die Elektrophoresekammern gelegt, wobei die Filterpapiere an den Seiten des Stärkels in dem Puffer der Kammer getränkt werden, um den Kontakt herzustellen.

Nach der Elektrophorese wird die Glasplatte in die Lösung des Färbemittels gelegt und genau wie ein Papierstreifen behandelt. Zur Anfärbung mit Amido-Schwarz genügt es, wenn man die Glasplatte mit dem Stärkel 30 sec in das Färbemittel legt. Schon bei dem zweiten Wechseln des Entfärbers löst sich das Stärkel von der Glasplatte und verliert nicht mehr seine Konsistenz.

Präparative Stärkel-Elektrophorese. Von 2 gleich behandelten Glasplatten wird eine zur Anfärbung und die andere zur Eluierung der Fraktionen benützt. Dabei soll folgendes beachtet werden: (1) Jeder Überschuss der

Probe (Heraustreten aus dem zusammengeschobenen Schlitz) muss vermieden werden; sonst zeigt sich nur auf der auf der Glasplatte aufliegenden Seite eine gute Trennung, während sich oben ein «Schwanz» bildet. (2) Bei der Anfärbung zieht sich das Stärkel zusammen. Die Lage der entsprechenden Fraktionen kann auf dem ungefärbten Streifen mit Hilfe eines Gummibandes festgestellt werden, auf das die Lage der Fraktionen von dem angefärbten Streifen übertragen wurde und das dann auf die Länge des ungefärbten Streifens ausgezogen wird.

Diese Methode bietet folgende Vorteile: (1) Kurze Dauer der Elektrophorese. Durch die geringe Schichtdicke wird die Dauer der Elektrophorese auf die der Papierelektrophorese reduziert. Für eine Trennung des Serums in 15 Fraktionen wird eine Laufzeit in Boratpuffer (nach SMITHIES) von 15 h bei 100 V benötigt. (2) Geringer Verbrauch von Stärke. (3) Bidimensionale Elektrophorese auf Stärkelglasplatten von 20 \times 20 cm. (4) Keine Sonderapparaturen werden benötigt. (5) Es konnten gegenüber der Methode von SMITHIES keine Nachteile in bezug auf den Trenneffekt festgestellt werden. (6) Das komplizierte Halbieren des Stärkels entfällt.

Summary. A modification of SMITHIES starch gel electrophoresis is presented. Thin starch gel layers (4 mm thick) were prepared on glass plates and used for analytical or preparative electrophoresis.

F. WAGNER ROMERO

Departamento de Bioquímica, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas (Venezuela), 2. Juni 1964.

A Method for Turbidimetric Measurement of Heparin: Its Application to the Estimation of Heparin in Aortic Tissue

Our previous studies¹⁻³ suggested the possible role of sulfated polysaccharides in the metabolism of aortic tissue during the atherosclerotic process. The presence of hyaluronic acid, heparitin sulfate and chondroitin sulfates including β -heparin⁴ in aortic tissue is well established^{5,6}, but only a few reports^{7,8} have so far described the occurrence of heparin in the aortic walls. Since heparin is a trace material scattered through connective tissues, the question as to whether heparin is present in aortic tissue is still unanswered. A selective method for measurement of heparin, therefore, offers a possibility for estimation of heparin contents in connective tissues by use of the quaternary ammonium salt fractionation methods for acid mucopolysaccharides (AMPS)⁹. This paper deals with the quantitative measurement of heparin by a turbidimetric method and its application to the estimation of heparin in aortic tissue.

As standard AMPS, heparin and heparitin sulfate (Upjohn Co.) and hyaluronic acid and chondroitin sulfates (Sigma Chemical Co.) were purified through Dowex 1-X2 columns by the stepwise elution method of SCHILLER et al.¹⁰, followed by dialyzation and lyophilization. AMPS were extracted from the intima-media layers of 6 adult human thoracic aortae and 10 bovine thoracic

aortae according to the method of DYRBYE and KIRK¹¹; average AMPS yields of 0.19 g per 100 g of starting wet tissue weight were obtained in both species. The extracted AMPS were then passed through Dowex 50 columns.

Quantities of heparin ranging from 20 to 200 μ g per ml of 1M acetate buffer (1M sodium acetate-acetic acid, pH 5.2) were added to test tubes in 1 ml aliquots; 1 ml of acetate buffer was used as a blank. 4 ml of 1.6M NaCl in 0.1% cetylpyridinium chloride (CPC) were added to each tube to bring to 5 ml the total volume (the final NaCl concentration was 1.28M in 0.08% CPC). After mixing the solutions, the tubes were warmed in a water

¹ K. MURATA, Jap. Heart J. 2, 198 (1961).

² K. MURATA, J. Gerontol. 17, 30 (1962).

³ K. MURATA, Naturwiss. 49, 39 (1962).

⁴ R. MARBET and A. WINTERSTEIN, Exper. 8, 41 (1952).

⁵ D. KAPLAN and K. MEYER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 105, 78 (1960).

⁶ E. BUDDECKE, J. Atheroscl. Res. 2, 32 (1962).

⁷ E. JORPES, H. HOLMGREN, and O. WILANDER, Z. mikr. anat. Forsch. 42, 279 (1937).

⁸ E. BUDDECKE, Z. physiol. Chem. 318, 33 (1960).

⁹ J. E. SCOTT, in *Methods of Biochemical Analysis* (Interscience Publishers Inc., New York 1960), vol. 8, p. 145.

¹⁰ S. SCHILLER, G. A. SLOVER, and A. DORFMAN, J. biol. Chem. 236, 983 (1961).

¹¹ M. DYRBYE and J. E. KIRK, J. Gerontol. 12, 20 (1957).