

physiological bathing medium has the much lower potassium concentration of 4.7 mM^7 , under normal conditions most of the stromal potassium would be found in the keratocytes. Although the limit of resolution of analysis is as low as $0.1 \mu\text{m}$, the potassium in our sections appeared to be uniformly distributed and not localized in the

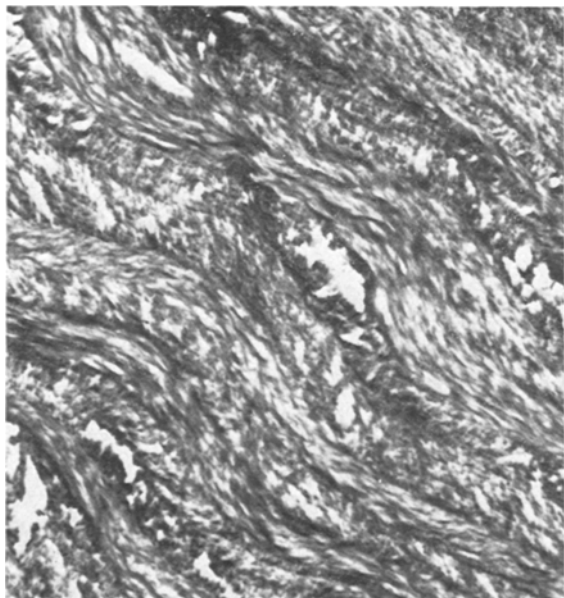


Fig. 3. Ultrathin section through unfixed, frozen corneal stroma showing the lamellae of collagen fibres. $\times 2500$.

keratocytes. This strongly suggests that during transfer of the sections they may become rehydrated when the potassium would diffuse through the tissue. It is not possible to know the permeability of the keratocyte cell membrane in an ultrathin section but if one calculates an extreme case when the permeability of the membrane is so high that its presence may be ignored, then it can easily be shown that in a cell $1 \mu\text{m}$ thick, 50% of the potassium would diffuse out in about 10^{-4} sec.

Two problems remain to be solved before intracellular distributions of sodium and potassium may be determined. First, the sensitivity of the X-ray activation analyzer to particular atoms must be calibrated and secondly the sections must remain frozen or dessicated throughout the preparation procedure. It is to be hoped that the diffusion of salts through dessicated biological material is negligible⁸.

Résumé. Une nouvelle technique pour découvrir sodium et potassium en sections glacées de tissus biologiques est décrite.

S. HODSON and J. MARSHALL

*Department of Physiology and Biochemistry, and
Department of Anatomy, Institute of Ophthalmology,
Judd Street, London WC1H 9QS (England), 21 April 1970.*

⁷ H. DAVSON, in *The Eye* (Academic Press, New York and London 1969), vol. 1.

⁸ We thank A.E.I. and Tube Investments for giving us free time on EMMA-4, and operating the instrument.

Die Isolierung von Ribonukleinsäuren aus menschlichen Knochenmarkzellen

Die hohe Aktivität von Ribonukleasen in den Zellen des blutbildenden Systems ist die Ursache dafür, dass unabgebaute Ribonukleinsäuren nach den herkömmlichen Methoden aus diesen Zellen nicht isoliert werden konnten¹. Erst die Auffindung von Substanzen, die dieses Enzym binden (Bentonit) oder inaktivieren (Natriumdodecylsulfat), hat die Präparation hochmolekularer Ribonukleinsäuren aus menschlichen Leukozyten ermöglicht^{2,3}. Nach ähnlichen Verfahren konnten wir nun erstmals weitgehend unabgebaute, biologisch aktive Ribonukleinsäuren aus menschlichen Knochenmarkzellen erhalten.

Die Entnahme des Knochenmarks gesunder Spender erfolgte in Intubationsnarkose aus dem rechten und linken Darmbein und aus dem Sternum. Insgesamt 27 Aspirationen ergaben 420 ml Mark, die in einem eiskühlten Gemisch aus 200 ml NaCl $0,15 \text{ M}$, 610 ml Phenol 90% und 16 ml Bentonit⁴ (10%, gelöst in NaCl $0,15 \text{ M}$) gesammelt wurden. Die Extraktion der cytoplasmatischen RNS erfolgte durch 15 min langes Rühren bei 4°C . Nach dem Abzentrifugieren der Phenolphase und zweimaligen Entweißen des Überstandes (340 ml) mit je 170 ml Phenol und Chloroform fiel bei Zusatz von 340 mg NaCl und 720 ml Äthanol 96 mg RNS aus. Die bei der ersten Zentrifugation erhaltene Interphase (290 ml) wurde dann zur Isolierung der m-RNS mit 218 ml Phenol 90%, 290 ml NaCl $0,15 \text{ M}$ und 2,9 g Natriumdodecylsulfat 15 min bei 65°C nachextrahiert. Die weitere Aufarbeitung

erfolgte wie für die cytoplasmatische RNS beschrieben und ergab 26 mg RNS.

Die durch Phenolextraktion in der Kälte erhaltene Ribonukleinsäurefraktion wies bei der Trennung im Saccharosegradienten Gipfel bei etwa 30S, 19S und 5S auf (Figur) und ist somit in ihrem Sedimentationsverhalten weitgehend mit den Präparationen aus anderen Geweben vergleichbar. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm hatte bereits nach der zweiten Entweißung mit Phenol-Chloroform einen Wert ($E_{280}:E_{260} = 0,48$), der auf weitgehende Proteinfreiheit schließen liess⁶.

Die Untersuchung der 65°F -Fraktion im Saccharosegradienten ergab das Vorliegen eines polydispersen Produktes, das vorwiegend aus Fraktionen bestand, die Sedimentationskoeffizienten zwischen 2 und 19S hatten

¹ D. BILLEN, T. LAPTISOPHON, E. W. FRAMPTON und M. R. SHEEK, *Tex. Rep. Biol. Med.* 23, 579 (1965).

² M. J. CLINE, *J. Lab. clin. Med.* 68, 33 (1966).

³ H. L. COOPER und J. E. KAY, *Biochim. biophys. Acta* 174, 503 (1969).

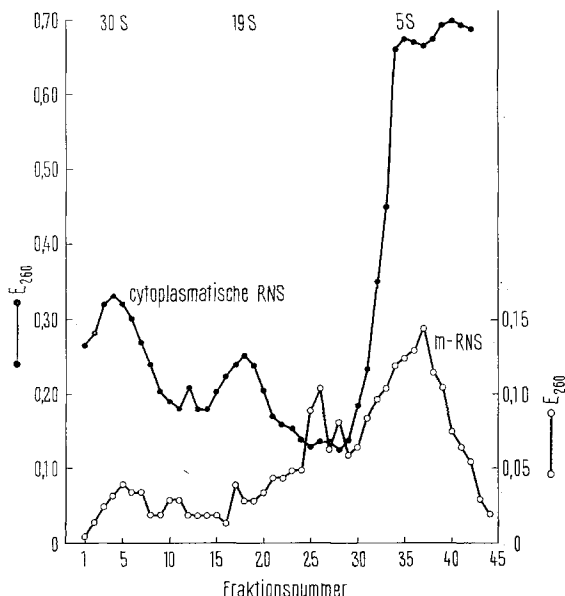
⁴ H. FRAENKEL-CONRAT, B. SINGER und A. TSUGITA, *Virology* 14, 54 (1961).

⁵ C. R. McEWEN, *Analyt. Biochem.* 20, 114 (1967).

⁶ O. WARBURG und W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* 370, 384 (1942).

(Figur). Der Zusatz dieser Fraktion zu einem zellfreien System aus Schweineleber stimulierte den Einbau von [14 C]-Leucin in Trichloressigsäure-fällbare Polypeptide zu 25%. Dieser Befund, sowie das Sedimentationsver-

halten dieser Präparation weisen darauf hin, dass es sich hier vornehmlich um RNS mit messenger-Charakter handelt. Die nach einer ähnlichen Methode von CLINE² aus pathologischen menschlichen Leukozyten erhaltene 60°-RNS weist eine sehr ähnliche Sedimentationskurve auf. Bei Inkubation der Leukozyten mit [3 H]-Uridin baute diese Fraktion die Radioaktivität besonders rasch ein⁷.



Trennung der cytoplasmatischen und m-RNS durch Zentrifugation im Saccharosegradienten (5–20%). Beckman Spinco L4, SW 65 Ti, 17 h bei 33000 U/min. Aus der Lage der Gipfel wurde unter Zuhilfenahme der Tabellen von McEWEN⁵ der angenäherte Wert der Sedimentationskoeffizienten bestimmt.

Summary. By use of bentonite and sodium dodecyl-sulfate, which bind or inhibit ribonucleases, pure RNA preparations were obtained from human bone marrow. Phenol extraction at 4°C yielded cytoplasmic RNA, which could be separated into 3 main peaks by sucrose density gradient centrifugation. Sedimentation coefficients of these peaks were about 30S, 19S, and 5S, respectively. Re-extraction of the phenolic interphase at 65° gave a polydisperse ribonucleic acid, sedimenting between 2S and 19S. This RNA is characterized by template activity and is supposed to be biologically active m-RNA.

K. LETNANSKY

Institut für Krebsforschung der Universität Wien,
Borschkegasse 8a, A-1090 Wien (Österreich), 20 April 1970.

⁷ Für die Durchführung der Punktionen danken wir Herrn Doz. Dr. A. PRIESCHING von der I. Chirurg. Universitätsklinik, Wien, herzlich.

Bestimmung der Eiweissbindung von Pharmaka in bikarbonatgepufferten Lösungen

Zur Bestimmung der Eiweissbindung von Arzneimitteln bei 37°C und pH 7,4 in bikarbonatgepufferten Lösungen sind die zur Zeit zuverlässigsten quantitativen Bestimmungsmethoden wie Ultrazentrifugation^{1,2}, Gleichgewichtsdialyse³⁻⁵ und Sephadex-Gelfiltration^{2,6-9} nicht gleich gut geeignet. Die Anwendung der Ultrazentrifugation und der Gleichgewichtsdialyse stösst unter diesen Bedingungen auf methodische Schwierigkeiten. In der Ultrazentrifuge entweicht CO₂ aus den zu untersuchenden Proben und der pH-Wert steigt an. Die Gleichgewichtsdialyse erfordert grossen arbeitstechnischen Aufwand, da infolge der langen Dialysezeit von 12–16 h bei 37°C steriles Arbeiten erforderlich ist⁵. Mit der Sephadex-Gelfiltration kann die Eiweissbindung ohne grosse Schwierigkeiten bei 37°C und pH 7,4 in bikarbonatgepufferten Lösungen bestimmt werden. Die Brauchbarkeit dieser Methode soll am Beispiel der Promazin-Albuminbindung demonstriert werden.

Material und Methodik. Es wurde das Bindungsvermögen einer Albuminlösung (Albumin vom Rind, trocken, «reinst»; Behring-Werke, Marburg) für Promazin bestimmt. Jeder Versuchsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 25 ml $1,5 \times 10^{-4}$ M Promazin und 2 g/100 ml Albumin. Als Lösungs- und Elutionsmittel wurden Phosphatpufferlösung nach Sørensen und Krebs-Ringer-Bikarbonatpufferlösung verwendet. Die Chromatographierohre waren von einem Glasmantel umgeben, der während der Gelfiltration mit Wasser von 37°C durchströmte wurde.

Die Bestimmung der Eiweissbindung von Promazin in Phosphatpufferlösung erfolgte bei pH 7,4 nach der Methode von KRIEGLSTEIN und KUSCHINSKY⁶.

Die Versuchsansätze mit Krebs-Ringer-Lösung wurden in 50 ml Erlenmeyerkolben durch Überleiten von Carbogen (5% CO₂ und 95% O₂) unter rotierenden Bewegungen 15 min bei 37°C äquilibriert. Schaumbildung wurde in der promazinhaltigen Albuminlösung auf diese Weise vermieden. Nach dem Äquilibrieren wurde unter ständigem Überleiten von Carbogen der pH-Wert des Versuchsansatzes kontrolliert und erforderliche Korrekturen durch Zufügen einiger Mikroliter 1 N Sodalösung vorgenommen. 20 ml des auf pH 7,4 eingestellten Versuchsansatzes wurden auf eine Sephadex-G 50-Säule von

¹ H. BÜTTNER und F. PORTWICH, *Arzneimittel-Forsch.* 11, 1133 (1961).

² W. SCHOLTAN, *Arzneimittel-Forsch.* 15, 1433 (1965).

³ B. D. DAVIS, *J. clin. Invest.* 22, 753 (1943).

⁴ W. SCHOLTAN, *Makromolek. Chem.* 54, 24 (1962).

⁵ P. SPRING, *Arzneimittel-Forsch.* 16, 346 (1966).

⁶ J. KRIEGLSTEIN und G. KUSCHINSKY, *Arzneimittel-Forsch.* 18, 287 (1968).

⁷ P. F. COOPER and G. C. WOOD, *J. Pharm. Pharmac.* 20, Suppl. 150 S (1968).

⁸ C. W. BURKE, *Biochim. biophys. Acta* 176, 403 (1969).

⁹ P. HOFMANN, J. KRIEGLSTEIN, E. MUTSCHLER und U. WOLLERT, *Arzneimittel-Forsch.* 20, 681 (1970).