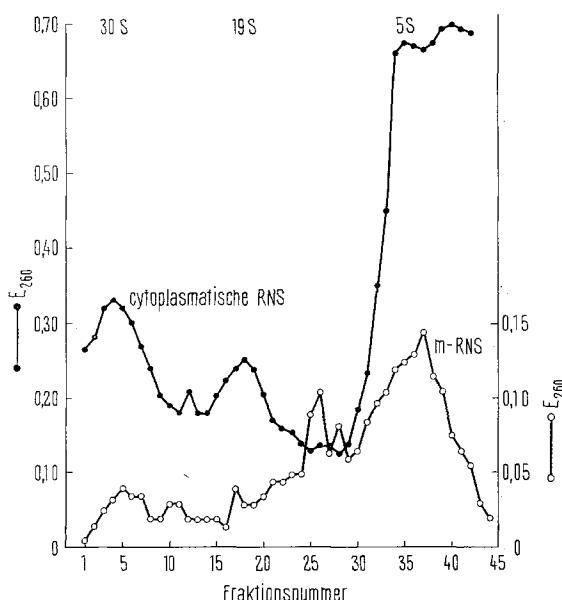


(Figur). Der Zusatz dieser Fraktion zu einem zellfreien System aus Schweineleber stimulierte den Einbau von [¹⁴C]-Leucin in Trichloressigsäure-fällbare Polypeptide zu 25%. Dieser Befund, sowie das Sedimentationsver-

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 erhaltenen 60°-RNS weist eine sehr ähnliche Sedimentationskurve auf. Bei Inkubation der Leukozyten mit [³H]-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 33 000 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 dodecylsulfate, 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}, Gleichgewichtsdialyse^{3–5} 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 Gesamtvolume von 25 ml 1,5 × 10⁻⁴ M Promazin und 2 g/100 ml Albumin. Als Lösungs- und Elutionsmittel wurden Phosphatpufferlösung nach Sörensen und Krebs-Ringer-Bikarbonatpufferlösung verwendet. Die Chromatographierohre waren von einem Glasmantel umgeben, der während der Gelfiltration mit Wasser von 37°C durchströmt 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 und G. C. WOOD, J. Pharm. Pharmac. 20, Suppl. 150 S (1968).

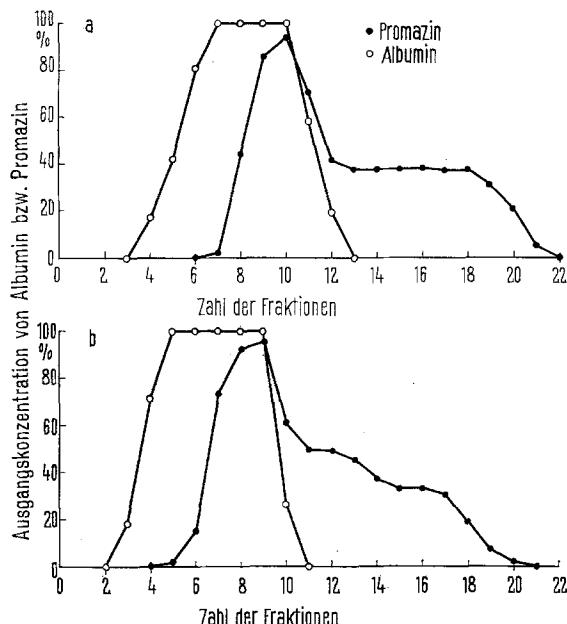
⁸ C. W. BURKE, Biochim. biophys. Acta 176, 403 (1969).

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

20 cm Höhe und 1,2 cm Durchmesser gebracht. Während der gesamten Versuchsdauer wurde Carbogen über die zu chromatographierende Lösung geleitet. Vor- und Nachelution wurden mit Carbogen äquilibrierter Krebs-Ringer-Lösung in der gleichen Weise vorgenommen. Der pH-Wert der Lösung blieb auf der so präparierten Säule konstant.

Zum Vergleich wurden bei Versuchen in Krebs-Ringer-Lösung unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die Säulen nicht mit Carbogen begast.

Ergebnisse und Diskussion. Bei Anwendung der Sephadex-Gelfiltration zur Bestimmung der Eiweissbindung kann im Gegensatz zur Ultrazentrifugation der pH-Wert



Gelfiltration einer bikarbonatgepufferten, promazinhaltigen 2%igen Rinderserumalbuminlösung. Abszisse: Zahl der Fraktionen (1 Fraktion = 3 ml). Ordinate: % der Ausgangskonzentration von Albumin bzw. Promazin. a) Beispiel einer Elutionskurve, die durch Überleiten von Carbogen über die zu untersuchende Lösung während der Gelfiltration gewonnen wurde. Die Plateauzone von Fraktion 13–18 entspricht der bei pH 7,4 vorliegenden freien Arzneimittelkonzentration. b) Beispiel einer Elutionskurve, die ohne Carbogenbegasung gewonnen wurde. In den Fraktionen 13–18 stellt sich kein Plateau ein.

einer mit Carbogen äquilibrierten und auf pH 7,4 eingestellten bikarbonatgepufferten Lösung konstant gehalten werden. Einfaches Überleiten von Carbogen über die zu chromatographierende Lösung verhindert ein Entweichen von CO_2 während der Gelfiltration. Die unter diesen Bedingungen in Bikarbonatpufferlösung gewonnenen Elutionskurven (Figur 1, a) zeigen ebenso wie die in Phosphatpufferlösung erhaltenen Kurven¹¹ ein Plateau (Fraktion 13–18 in Figur 1, a), das der bei pH 7,4 vorliegenden Konzentration an freiem Arzneimittel entspricht. Wird kein Carbogen über die zu chromatographierende bikarbonatgepufferte Lösung geleitet, so ändert sich während der Gelfiltration deren Wasserstoffionenkonzentration. Die so gewonnene Elutionskurve zeigt keine Plateauzone (Figur 1, b). Eine Bestimmung der Eiweissbindung ist unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Die in Bikarbonatpufferlösung unter Carbogenbegasung und in Phosphatpufferlösung gefundenen Werte stimmen gut überein. So wird in einer Bikarbonatpufferlösung, die 2 g/100 ml Albumin und $1,5 \times 10^{-4} M$ Promazin enthält, bei pH 7,4 und 37°C ein prozentualer Anteil an freier Substanz von $38,0\% \pm 0,7$ (angegeben als $\bar{x} \pm s_x$; $n = 6$) bestimmt. In einer Phosphatpufferlösung ergibt sich unter den gleichen Bedingungen ein Wert von $36,2\% \pm 0,8$ (angegeben als $\bar{x} \pm s_x$; $n = 6$). Die Werte unterscheiden sich bei einem Vergleich mit dem t-Test nicht signifikant. Andererseits sind in verschiedenen Pufferlösungen geringe Unterschiede zu erwarten¹⁰. Konstante pH-Bedingungen können in prinzipiell gleicher Weise auch bei der Gleichgewichtsdialyse geschaffen werden⁶. Die Sephadex-Gelfiltration besitzt jedoch gegenüber der Dialysemethode den Vorteil einer relativ kurzen Bestimmungszeit⁶. Sterile Arbeitsbedingungen erscheinen deshalb nicht erforderlich.

Summary. A gel filtration method is described for quantitative estimation of protein binding of drugs at 37°C and pH 7.4 in solutions containing bicarbonate buffer.

E. JÄHNCHEN

Pharmakologisches Institut der Universität,
D-6500 Mainz (Deutschland), 8. April 1970.

¹⁰ W. SCHOLTAN, Arzneimittel-Forsch. 11, 707 (1961).

¹¹ J. KRIEGLSTEIN und G. KUSCHINSKY, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 262, 1 (1969).

Cinephotographic Superposition as a Technique for the Analysis of Sub-Cellular Movement

A given signal containing much random information in the form of 'noise', and non-random information in the shape of a constant signal that cannot instantaneously be differentiated from its background, can be discerned by the integration of the whole signal over a period of time. The random information then becomes self-cancelling, whereas that which is constant is additive, and is thus reinforced^{1,2}.

Similar considerations can be applied to microscopic as well as to other visual information, and random saltatory movements of sub-cellular particles should cancel out should it prove possible to integrate this information over a sufficient period of time.

Such a possibility is provided by the technique of time-lapse microcinematography, and this was therefore

tested using the cleaving eggs of the serpulid worm *Pomatoceros triquetus*.

Eggs and sperm were collected after removal of the worms from their hard limy tubes, and fertilization was achieved *in vitro*³. Cleaving eggs were then filmed by time-lapse using a Reichert Zetopan microscope with a Bolex H16 cinecamera. Time intervals were determined by a Prior timing unit and a locally devised shutter release.

¹ R. B. BLACKMAN and J. W. TUKEY, Bell Syst. tech. J. 37, 185, 485 (1958).

² D. M. A. MERCER, *Circadian Clocks* (North Holland Publishing Co., Amsterdam 1965).

³ J. B. CRAGG, J. mar. biol. Ass. UK. 23, 483 (1939).