

Nucleinsäuren in Chloroplasten

II. Isolierung und Charakterisierung der Chloroplasten-Ribosomen von *Antirrhinum majus*

HANS GEORG RUPPEL

Botanisches Institut der Universität Köln

(Z. Naturforsch. 23 b, 997—1004 [1968]; eingegangen am 19. Januar 1968)

Methods for very efficient isolation of non-degraded chloroplasts from *Antirrhinum majus* are described. When studied in the analytical ultracentrifuge, isolated ribosomes of such chloroplasts show a single symmetrical 68s peak. Extraction of the ribosomal RNA from chloroplasts and chromatographic separation on methylated serum albumin yields 4 main fractions: (1) low molecular weight RNA (fraction I b) with $s_{20} = 5.5$, (2) high molecular weight RNA (fraction III) with $s_{20} = 16-17$, (3) high molecular weight RNA (fraction V) with $s_{20} = 23$, and (4) a RNA fraction (fraction VI) heterogeneous in molecular size. In addition data are presented which show a higher resolution of RNA species by polyacrylamide gel electrophoresis than by chromatographic fractionation on methylated serum albumin. The high molecular weight RNA (16–17s) of chloroplasts differs from the corresponding "light" ribosomal RNA of the cytoplasm in its electrophoretic mobility.

Untersuchungen¹ über die Ribonucleinsäuren (RNS) in Chloroplasten, die mit organischen Lösungsmittelgemischen aus den Blättern von *Antirrhinum majus* isoliert worden waren, ergaben, daß neben säurelöslicher RNS mehrere hochmolekulare RNS-Fractionen in den Plastidenpräparaten vorkommen. Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei vorwiegend um ribosomale RNS handelt. Seit den Untersuchungen von LITTLETON² wissen wir, daß in den Chloroplasten höherer Pflanzen Ribosomen vorkommen, die sich von den entsprechenden Cytoplasma-Ribosomen durch ihre kleinere Sedimentationskonstante unterscheiden. Größe und Zusammensetzung der RNS-Fractionen dieser Plastiden-Ribosomen sind bisher jedoch noch unklar.

Nach den Untersuchungen von WOLLGIEHN und Mitarbb.³ besitzen die Chloroplasten-Ribosomen von *Nicotiana*, *Pisum* und *Spinacea* zwei hochmolekulare Ribonucleinsäuren, die sich bei Chromatographie an methyliertem Serumalbumin wie die ribosomalen RNS-Fractionen des Cytoplasmas verhalten. Da die hochmolekularen RNS-Fractionen der Chloroplasten und des Cytoplasmas die gleiche Basenzusammensetzung aufweisen, könnte man schließen, daß in beiden Ribosomenarten die gleichen RNS-Fractionen vor-

kommen, wenn auch vielleicht in unterschiedlichen Mengenverhältnissen. Zu ähnlichen Ergebnissen führten die Experimente von BALTUS und QUERTIER⁴ an Ribosomen von *Acetabularia*. SPENCER und WHITFIELD⁵ fanden dagegen in den Chloroplasten-Ribosomen von *Spinacea*, *Raphanus*, *Lycopersicon*, *Pisum*, *Brassica* und *Cucumis* nur eine 16s-RNS, während sie in den entsprechenden Cytoplasma-Ribosomen sowohl eine 16s- als auch eine 26s-RNS nachweisen konnten. Mit Hilfe empfindlicher Nachweismethoden gelang es STUTZ und NOLL⁶, das Sedimentationsprofil der ribosomalen RNS aus Chloroplasten höherer Pflanzen dahingehend zu interpretieren, daß in den Chloroplasten-Ribosomen 16s- und 23s-RNS (analog der RNS-Garnitur der 70s-Ribosomen von Bakterien) vorkommen, während sie in den Cytoplasma-Ribosomen das Vorkommen einer 16s- und 26s-RNS bestätigen konnten. Zu ähnlichen Ergebnissen führten die Untersuchungen von LOENING und INGLE⁷, die in grünen Geweben einiger höherer Pflanzen neben den beiden typischen ribosomalen Ribonucleinsäuren der Cytoplasma-Ribosomen (18s und 25s) zwei zusätzliche RNS-Komponenten (16s und 23s) nachweisen konnten (Polyacrylamidgel-Elektrophorese). Da diese RNS-Fractionen in chloro-

¹ H. G. RUPPEL, Z. Naturforsch. 22 b, 1068 [1967].² J. W. LITTLETON, Exp. Cell Res. 26, 312 [1962].³ R. WOLLGIEHN, M. RUESS u. D. MUNSCH, Flora [Jena] 157, 92 [1966].⁴ E. BALTUS and J. QUERTIER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 119, 192 [1966].⁵ D. SPENCER and P. R. WHITFIELD, Arch. Biochem. Biophysics 117, 337 [1966].⁶ E. STUTZ and H. NOLL, Proc. nat. Acad. Sci. USA 57, 774 [1967].⁷ U. E. LOENING u. J. INGLE, Nature [London] 215, 363 [1967].

phyllfreien Geweben nicht vorkamen, sich jedoch in Chloroplastenpräparaten anreichern ließen, nehmen LOENING und INGLE an, daß es sich bei diesen Ribonucleinsäuren um RNS-Komponenten der Chloroplasten-Ribosomen handeln müsse.

Bei einem Vergleich der Chloroplasten-RNS mit der gesamten RNS der Blätter von *Antirrhinum majus* kamen wir zu dem Ergebnis, daß die Chloroplasten-Ribosomen sicher eine „leichte“ ribosomale RNS (16s-RNS) besitzen, daneben eine geringe Menge 26s-RNS und eine dritte heterogene RNS-Fraktion. Da wir befürchten müssen, daß die Chloroplasten-Präparate, die im organischen Medium isoliert wurden, mit Cytoplasma verunreinigt waren, konnten wir nicht entscheiden, ob die „schwere“ ribosomale RNS (26s-RNS) wirklich in den Plastiden-Ribosomen enthalten ist, oder ob ihr Vorkommen nur den Kontaminationsgrad des Präparates mit Cytoplasma-Ribosomen widerspiegelt.

Um diese Frage zu klären, isolierten wir aus Chloroplasten, die mit wäßrigen Extraktionsmedien aus jungen Blättern von *Antirrhinum* erhalten wurden, die Ribosomen und untersuchten deren Ribonucleinsäuren. Über diese Experimente soll in vorliegender Arbeit berichtet werden.

Isolierung der Ribosomen

Aus den grünen Blättern junger Pflanzen von *Antirrhinum majus* gelang es, mit wäßrigen Extraktionsmedien ein Chloroplasten-Präparat zu gewinnen, das auf Grund seiner Reinheit als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Plastiden-Ribosomen verwendet werden konnte. Die Chloroplasten wurden in 0,025-m. Tris-HCl-Puffer (pH 7,8), der zu 4% mit Triton-X 100 versetzt war, in einem Glashomogenisator aufgeschlossen. Durch diese Behandlung wurde die Chloroplastenstruktur zerstört, so daß die Ribosomen freigesetzt werden konnten, während die vorhandenen Zellkerne intakt blieben⁵. Diese wurden mit den Chloroplasten-Fragmenten durch fraktioniertes Zentrifugieren von den Ribosomen abgetrennt. Die Ribosomen wurden in einem kleinen Volumen Tris-HCl-Puffer (Medium b) resuspendiert und ihre Sedimentationskonstante in einer Analytischen Ultrazentrifuge bestimmt. Das in Abb. 1 a dargestellte Sedimentationsdiagramm der Chloroplasten-Ribosomen zeigt zwei Schlierengipfel, die den Chloroplasten-Ribosomen mit einer Sedimentationskonstanten von 68s und einer Proteinfraction, deren Sedimentationskonstante von 18s auf die sogenannte

„fraction I“ hinweist, zuzuordnen sind. Diese Proteinfraction war in unseren Ribosomenpräparaten aus Plastiden, wenn auch in geringer Konzentration, stets nachzuweisen. Die Ursache hierfür lag wohl darin, daß ein mehrmaliges Waschen der Präparate unterblieb, um allzu große Verluste an Ribosomen zu vermeiden. Wie zu Beginn eines solchen Sedimentationsversuches beobachtet werden konnte, enthielten die Ribosomenpräparate in sehr geringer Konzentration Polysomen (100–110s). Cytoplasma-Ribosomen konnten in den Präparaten nicht nachgewiesen werden.

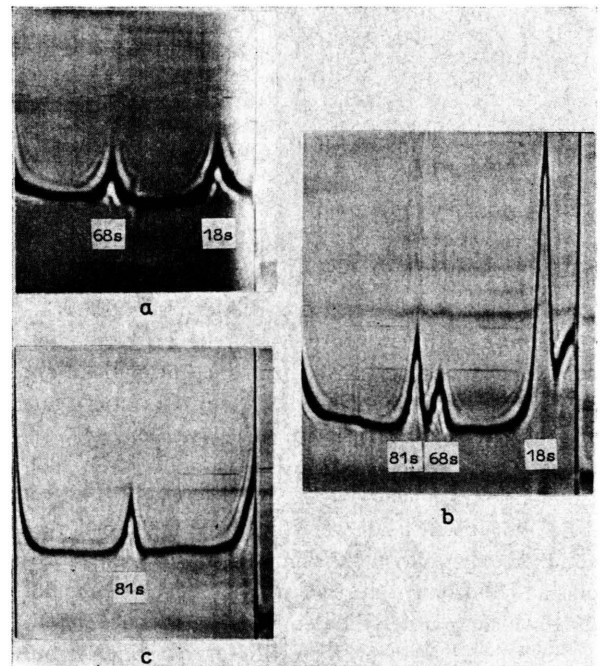


Abb. 1. Sedimentations-Diagramme (Schlierenoptik) dreier Ribosomen-Präparate: (a) Chloroplasten-Ribosomen, (b) ein Mischpräparat von Cytoplasma- und Chloroplasten-Ribosomen aus Blatthomogenaten und (c) Cytoplasma-Ribosomen aus Wurzeln von *Antirrhinum majus*. Sedimentationsrichtung von rechts nach links; 42040 UpM, 20 °C, Philpotwinkel 50° (b) und 40° (a, c).

Wie man aus Abb. 1 b entnehmen kann, besteht ein Ribosomenpräparat aus Blatthomogenat aus drei Hauptkomponenten mit den Sedimentationskonstanten 81s, 68s und 18s, die – in der Reihenfolge der Werte – den Cytoplasma-Ribosomen, den Chloroplasten-Ribosomen und „fraction I“ zuzuordnen sind. Da ein Aufplatzen der Chloroplasten während der Aufarbeitung des Blattmaterials nicht zu vermeiden ist, enthält ein Blatthomogenat neben Cytoplasma-Ribosomen stets Chloroplasten-Ribosomen.

Außer den Ribosomen-Monomeren kommen in solchen Präparaten auch Polysomen mit den Sedimentationskonstanten von 100–120s vor. Eine sehr langsam sedimentierende Komponente (4s) ist wohl der Fraktion der löslichen Proteine zuzuordnen.

Versuche, die Cytoplasma-Ribosomen durch Zonenzentrifugation in Saccharosegradienten von den Chloroplasten-Ribosomen abzutrennen, verliefen sehr unbefriedigend. Daher isolierten wir aus den Wurzeln von *Antirrhinum* ein Ribosomenpräparat, dessen Sedimentationsprofil in Abb. 1 c dargestellt ist. Nach der Schlierenaufnahme lassen sich im Präparat nur Cytoplasma-Ribosomen nachweisen. Da aber auch in Wurzelzellen Plastiden mit einer sehr geringen Anzahl Ribosomen nachgewiesen wurden⁸, könnte ein Ribosomenpräparat aus *Antirrhinum*-Wurzeln ebenfalls Plastiden-Ribosomen enthalten. Dann wäre jedoch in unserem Fall die Zahl der Chloroplasten-Ribosomen gegenüber der Menge der Cytoplasma-Ribosomen so gering, daß sie weder in der Ultrazentrifuge beobachtet werden können (Abb. 1 c), noch daß ihre charakteristische „leichte“ ribosomale RNS-Fraktion elektrophoretisch nachgewiesen werden kann (Abb. 5 i). Ebenso auffallend in unserem Präparat ist das Fehlen des 18s-Proteins, der „fraction I“.

Die RNS der Ribosomen

Zur Bestimmung der RNS in den Ribosomen wurden die Ribosomenpräparate mit Tris-HCl-Puffer, pH 7,8, in Gegenwart von Bentonit und Dodecylsulfat extrahiert. Anschließend wurde die Suspension mit puffergesättigtem Phenol geschüttelt und zentrifugiert. Aus dem proteinfreien wäßrigen Überstand konnte nach 16-stdg. Dialyse gegen 0,1-m. NaCl-0,05-m. Phosphatpuffer, pH 6,8, durch Zugabe von Äthanol ein Niederschlag erhalten werden, der in dem Dialysepuffer löslich war und nach Adsorption an einer Säule mit methyliertem Serumalbumin chromatographisch untersucht wurde. Ein Elutionsdiagramm der RNS-Fractionen aus Plastiden-Ribosomen ist in Abb. 2 dargestellt. Eluiert wurden die einzelnen UV-absorbierenden Fraktionen mit Phosphatpuffer steigender NaCl-Konzentration.

Neben zwei niedermolekularen RNS-Fractionen, die mit I a und I b gekennzeichnet wurden und deren Sedimentationskonstanten mit 4s beziehungsweise 5s bestimmt werden konnten, gelang es, zwei hoch-

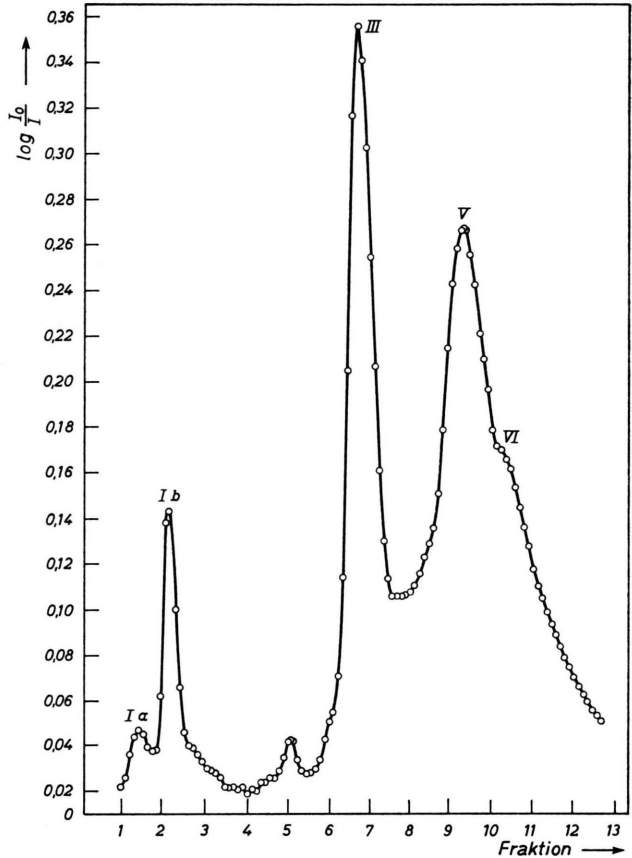


Abb. 2. Fraktionierung der Nucleinsäuren aus Chloroplasten-Ribosomen von *Antirrhinum majus* mit Hilfe der Säulenchromatographie an methyliertem Serumalbumin. Elution mit 0,05-m. Phosphatpuffer, pH 6,8, steigender NaCl-Konzentration: 0,4-m.—1,2-m. NaCl. $\log I_0/I$ = UV-Absorption bei 254 nm.

molekulare Fraktionen zu eluieren. Sie wurden mit III und V gekennzeichnet; Fraktion V wies eine Schulter auf, die als Fraktion VI bezeichnet wurde. Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten ergab für Fraktion III und V Werte von 16–17s beziehungsweise 23s. Die Ultrazentrifugen-Experimente ließen jedoch für Fraktion VI eine beträchtliche Heterogenität im Sedimentationsprofil erkennen, so daß eine exakte Messung der Sedimentationswerte nicht möglich war. Unter diesen RNS-Fractionen aus gereinigten Ribosomenpräparaten konnten wir keine Fraktion mit einer Sedimentationskonstanten von 26s nachweisen. Daher muß aus diesen Versuchen geschlossen werden, daß die Chloroplasten-Ribosomen eine „leichte“ ribosomale RNS von 16 bis 17s besitzen, eine „schwere“ RNS-Komponente von 23s und eine zusätzliche Fraktion mehrerer

⁸ E. H. NEWCOMB, J. Cell Biol. 33, 143 [1967].

RNS-Komponenten unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung. Es fehlt jedoch die für die Cytoplasma-Ribosomen typische „schwere“ RNS von 26s.

Unsere früheren Untersuchungen¹ an ganzen Chloroplasten, die mit organischen Lösungsmitteln aus Blättern isoliert worden waren, zeigten nach Säulenchromatographie der Nucleinsäuren neben Fraktion III und V noch einen zusätzlichen Elutionsgipfel, der als Fraktion IV bezeichnet wurde. Die Sedimentationskonstante der Hauptkomponente dieser Fraktion betrug 26s. Nach vorstehenden Ex-

perimenten ist es leicht einzusehen, daß diese Fraktion IV, wie wir schon früher vermutet hatten, aus einer Verunreinigung der Chloroplasten-Präparate mit Cytoplasma-Ribosomen resultiert.

Vergleicht man nun die Nucleinsäurefraktionen der Plastiden-Ribosomen mit denen eines Ribosomen-Mischpräparates (Abb. 3) oder den RNS-Komponenten aus Wurzeln von *Antirrhinum* (Abb. 4), so kann man immer wieder feststellen, daß die Existenz von Cytoplasma-Ribosomen mit dem Auftreten der 26s-RNS im Elutionsdiagramm (Fraktion IV) eng verknüpft ist.

Sowohl im Ribosomen-Mischpräparat als auch unter den Nucleinsäurefraktionen der Wurzeln konnte eine niedermolekulare RNS mit einer Sedimentationskonstanten von 5–5,5s nachgewiesen werden. Ihre Lage im Elutionsdiagramm (unter Verwendung des angegebenen Elutionsgradienten) befand sich zwischen Fraktion I a und II. Daher kann sie wahrscheinlich mit Fraktion I b gleichgesetzt werden.

Acrylamidgel-Elektrophorese

Eine weitere Möglichkeit zur qualitativen Untersuchung der Nucleinsäuren bot ihre elektrophoretische Auftrennung in Polyacrylamidgel. Im Prinzip richteten wir uns nach der von PEACOCK und DINGMAN⁹ verwendeten Technik, die speziell für die RNS-Trennung ausgearbeitet worden ist. Die Erfahrung zeigte jedoch, daß diese Methodik für unsere Frage-

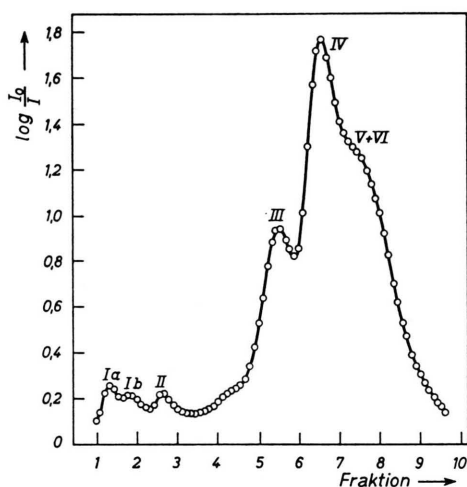


Abb. 3. Fraktionierung der Nucleinsäuren aus einem Ribosomen-Mischpräparat (Cytoplasma- und Chloroplasten-Ribosomen). Weitere Angaben bei Abb. 2.

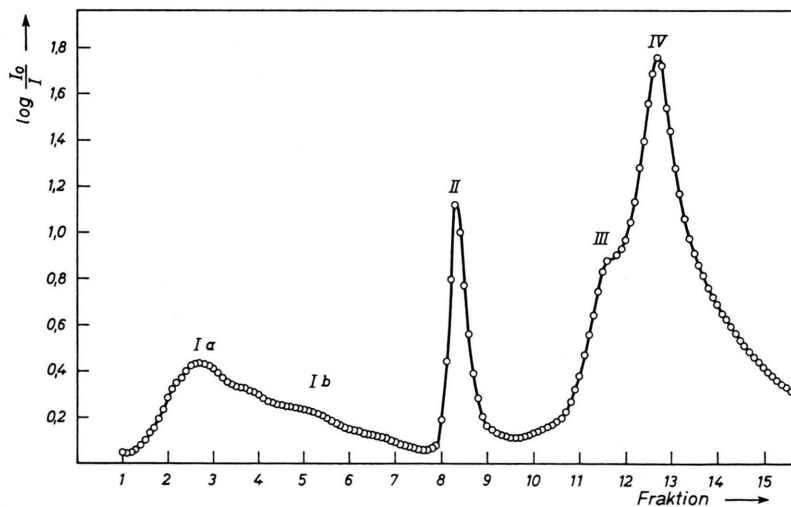


Abb. 4. Fraktionierung der Nucleinsäuren aus den Wurzeln von *Antirrhinum majus*. Weitere Angaben bei Abb. 2.

⁹ A. C. PEACOCK and C. W. DINGMAN, *Biochemistry* **6**, 1818 [1967].

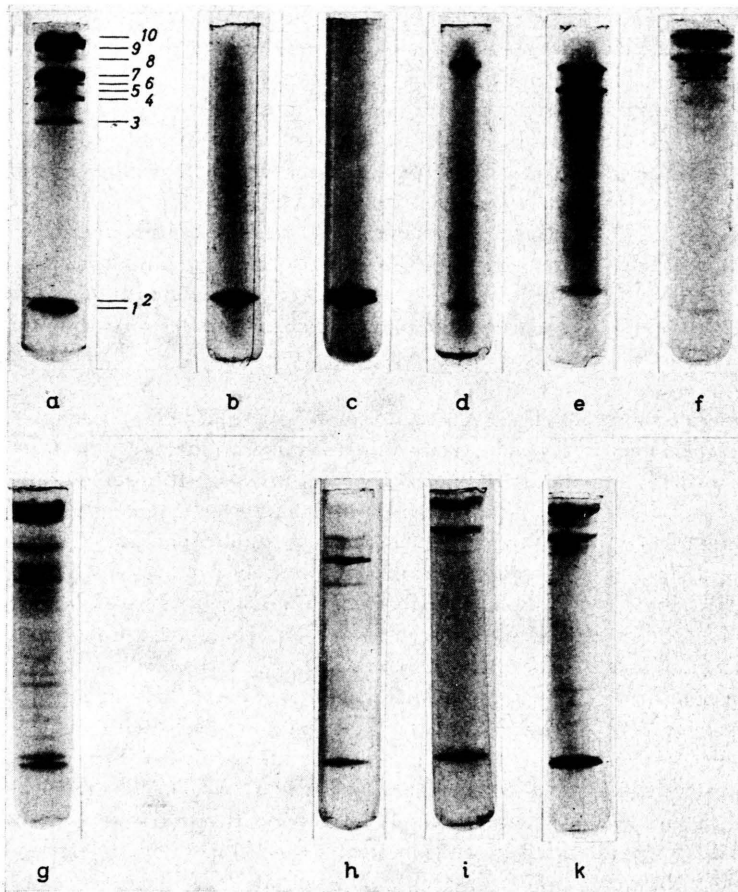


Abb. 5. Acrylamid-Gel-Elektrophorese verschiedener Nucleinsäurepräparate: (a) die gesamten, aus grünen Blättern von *Antirrhinum majus* extrahierbaren Nucleinsäuren, (b) – (f) Nucleinsäurefraktionen, die nach säulenchromatographischer Auftrennung (MAK) der gesamten Blatt-Nucleinsäuren erhalten wurden, Nucleinsäuren aus (g) einem Ribosomen-Mischpräparat (Chloroplasten- und Cytoplasma-Ribosomen), (h) aus Chloroplasten-Ribosomen, (i) aus Wurzeln und (k) aus Blüten von *Antirrhinum majus*.

stellung in einigen Punkten abgeändert werden mußte. Wir verweisen an dieser Stelle auf den experimentellen Teil.

Das Elektropherogramm eines Präparates, das die gesamten, unter unseren Bedingungen aus grünen Blättern von *Antirrhinum* extrahierbaren Nucleinsäuren enthielt, ist in Abb. 5 a dargestellt. Die neben dem Pherogramm abgebildeten Zahlen bezeichnen jeweils eine bestimmte Bande, welche die Lage einer Nucleinsäurefraktion wiedergibt. Nr. 1 und 2 bezeichnen relativ rasch wandernde Nucleinsäuren, während die Banden Nr. 9 und 10 zu den extrem langsamen gehören. Auf den ersten Blick lag die Vermutung nahe, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Nucleinsäuren im elektrischen Feld ihrer Ladung und somit ihrer Molekülgröße direkt proportional ist. Der Versuch, diese Vermutung zu prüfen, schließt das Problem der Identifikation der einzelnen Banden, das heißt ihre Zuordnung zu einzelnen (bekannten) Nucleinsäurefraktionen ein.

Wie Abb. 5 a zeigt, kann man ohne Mühe in einem Extrakt, der alle Nucleinsäuren enthält, 10 Banden, das heißt 10 Nucleinsäurefraktionen unterscheiden. Das Auftragen konzentrierterer Lösungen auf das Gel, um eventuell bei normaler Verdünnung nicht oder kaum sichtbare Banden nachzuweisen, führte in unserem Falle zu einer Aggregation der Nucleinsäuren und damit zu einer Verschmierung der Banden.

Die zur Identifikation verwendeten Nucleinsäurefraktionen aus Blattextrakten sammelten wir nach deren chromatographischer Auftrennung an methyliertem Serumalbumin, dialysierten die Fraktionen gegen 0,1-m. NaCl-0,05-m. Phosphatpuffer, pH 6,8, um die Salzkonzentration zu verringern und fällten die Säuren durch Zugabe von Äthanol. Die Präzipitate wurden in 3 – 5 ml Tris-EDTA-Puffer, pH 8,3, gelöst und anschließend der Elektrophorese unterworfen.

In den Abb. 5 b–f werden die entwickelten Pherogramme der einzelnen Nucleinsäurefraktionen wiedergegeben. Dabei entsprechen Pherogramm 5 b der Nucleinsäurefraktion I a = 4s-RNS, Pherogramm 5 c der Fraktion I a und I b = 4s-RNS und 5s-RNS, Pherogramm 5 d der Fraktion II = DNS, Pherogramm 5 e der Fraktion II = DNS und Fraktion III = wahrscheinlich 2 „leichte“ ribosomale RNS (16 bis 17s und ?) und schließlich Pherogramm 5 f den Fraktionen III (nur der 17s-Anteil), IV, V und VI = „schwere“ ribosomale RNS (23s und 26s) sowie RNS-Fraktionen unterschiedlicher Größe und Herkunft.

Vergleichen wir nun diese Banden beziehungsweise Fraktionen mit den durch Zahlen gekennzeichneten Banden der Abb. 5 a, so können wir versuchen zuzuordnen: Bande Nr. 1 = 4s-RNS; Bande Nr. 2 = 5s-RNS; Bande Nr. 3 ist bisher nicht identifiziert; Bande Nr. 4 könnte „leichte“ ribosomale RNS der Chloroplasten-Ribosomen sein (Abb. 5 h), die in den Cytoplasma-Ribosomen der Wurzeln (Abb. 5 i) und Blüten (Abb. 5 k) zu fehlen scheint; Bande Nr. 5 ist wahrscheinlich aus der heterogenen Fraktion VI; Bande Nr. 6 = DNS, die sich sehr leicht auswaschen läßt (s. Abb. 5 d und e); Bande Nr. 7 = „leichte“ ribosomale RNS der Cytoplasma-Ribosomen (16–17s), die besonders deutlich in den Präparaten aus Wurzeln und Blüten (Abb. 5 i und 5 k) auftritt; Bande Nr. 9 und 10 sind vielleicht den „schweren“ ribosomalen RNS-Fraktionen (23s und 26s) oder hochmolekularer Kern-RNS zuzuordnen.

Auffallend ist auch, daß die hochmolekularen Fraktionen III–IV in den Pherogrammen der Abb. 5 e und 5 f relativ viele, wenn auch schwach ausgebildete Banden hervorbringen. Das Pherogramm der Abb. 5 g, das die Nucleinsäurefraktionen eines Ribosomen-Mischpräparates zeigt, also eine Anreicherung der ribosomalen RNS und der mit den Polysomen verbundenen Messenger-RNS (m-RNS) darstellt, bietet ebenfalls eine überraschend große Zahl von Banden. Dies könnte von einem partiellen Abbau der hochmolekularen RNS-Fraktionen herrühren. Wir vermuten jedoch, daß es sich hierbei hauptsächlich um m-RNS unterschiedlicher Größe handelt. Daß das Ribosomen-Mischpräparat auch 4s-RNS enthält, liegt daran, daß das Präparat nur einmal gewaschen wurde und somit die säurelösliche RNS mit einschließt.

Die in Abb. 5 d zu beobachtende Fraktion zwischen der Bande Nr. 6 = DNS und der schnell wandernden Bande Nr. 2 (vermutlich ein Rest der 5s-RNS) konnte noch nicht identifiziert werden. Die Frage, ob sie die RNS-Fraktion darstellt, welche die DNS-Fraktion nach Säulenchromatographie an methyliertem Serumalbumin begleitet^{10,11}, muß vorerst unbeantwortet bleiben. Versuche, durch thermische Denaturierung der DNS oder enzymatischen Abbau die Fraktion II (nach MAK-Chromatographie) analytisch weiter aufzuschließen, könnte in Verbindung mit der Gelelektrophorese einige Fortschritte bringen.

Diese Elektrophorese-Experimente bestätigen weitgehend unsere durch Säulenchromatographie erhaltenen Befunde: Die Chloroplasten-Ribosomen höherer Pflanzen besitzen eine „leichte“ ribosomale RNS mit der Sedimentationskonstanten von 16–17s, die sich wahrscheinlich von der entsprechenden RNS der Cytoplasma-Ribosomen unterscheidet; darüberhinaus enthalten sie mehrere RNS-Fraktionen unterschiedlicher Größe, von denen eine die Sedimentationskonstante von 23s besitzt. Dieser Befund steht im Hinblick auf das Sedimentationsverhalten der Plastiden-Nucleinsäuren in Einklang mit den Ergebnissen von SRUTZ und NOLL⁶, die in den Plastidenribosomen höherer Pflanzen eine 16s- und eine 23s-RNS nachweisen konnten. Hinsichtlich der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit der „leichten“ ribosomalen RNS-Komponenten aus Cytoplasma und Plastiden bestätigen unsere oben genannten Ergebnisse weitgehend die Befunde von LOENING und INGLE⁷, die ebenfalls ein unterschiedliches elektrophoretisches Verhalten dieser RNS-Fraktionen zeigen konnten. Angaben^{3,4} über das Vorkommen einer 26s-RNS in Chloroplasten beziehungsweise in Chloroplasten-Ribosomen höherer Pflanzen dürften, falls es bezüglich der Größe der ribosomalen RNS-Komponenten keine artspezifischen Unterschiede gibt, auf einer Verunreinigung der Plastidenpräparate mit Cytoplasma-Ribosomen beruhen. Eine sorgfältige Überprüfung dieser Befunde wäre wünschenswert.

Neben den hochmolekularen RNS-Fraktionen enthalten unsere gereinigten Ribosomenpräparate aus Chloroplasten eine niedermolekulare RNS mit einem Sedimentationswert von 5,0–5,5s.

Weitere Aufschlüsse über die RNS-Garnitur der Chloroplasten höherer Pflanzen bringen Elektro-

¹⁰ G. RICHTER u. H. SENGER, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **95**, 362 [1965].

¹¹ H. CHROBOZEK and J. H. CHERRY, *J. molecular Biol.* **19**, 28 [1966].

phorese-Versuche mit Nucleinsäure-Präparaten weißer und ergrünender Blatteile von *Allium porrum*; über diese Experimente wird demnächst berichtet.

Experimenteller Teil

Darstellung der Chloroplasten-Präparate

Blätter nicht blühender Pflanzen von *Antirrhinum majus* Sippe 50 wurden mit Hilfe einer Dreiwalzenmühle in folgendem Medium (Medium a) aufgeschlossen: 0,4-m. Saccharose, 0,025-m. Tris-HCl-Puffer (pH 7,8), 0,01-m. KCl, 0,01-m. MgSO₄ und $4 \cdot 10^{-3}$ -m. Mercaptoäthanol. Der Blattbrei wurde durch ein Faltenfilter gedrückt und das Filtrat bei 1000 g (10 Min.) zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment nochmals in Medium a aufgenommen und bei 1000 g (20 Min.) zentrifugiert. Das Sediment besteht aus Chloroplasten und einigen Kernen, enthält aber keine Cytoplasma-Ribosomen (nach Ultrazentrifugen-Test).

Darstellung der Chloroplasten-Ribosomen

Das Chloroplasten-Präparat wurde in folgendem Medium (Medium b) aufgenommen und homogenisiert: 0,025-m. Tris-HCl-Puffer (pH 7,8), 0,01-m. MgSO₄, $4 \cdot 10^{-3}$ -m. Mercaptoäthanol und versetzt mit Triton-X 100, einem nicht-ionischen Detergens, bis zur Endkonzentration von 4% (v/v). Durch diese Behandlung wird die Chloroplasten-Struktur zerstört, während die Zellkerne intakt bleiben. Diese wurden zusammen mit den Chloroplasten-Bruchstücken bei 35 000 g (30 Min.) abzentrifugiert. Der klare, bräunlich gefärbte Überstand wurde dann bei 80 000 g (120 Min.) zentrifugiert. Das anfallende Sediment wurde in einem kleinen Volumen von Medium b (aber ohne Detergens) suspendiert und nochmals bei 80 000 g (120 Min.) zentrifugiert. Das Sediment besteht aus Chloroplasten-Ribosomen und einer geringen Menge Protein („fraction I“).

Darstellung der Cytoplasma-Ribosomen

Sorgfältig gereinigte Wurzeln von *Antirrhinum* wurden in Medium a mit Hilfe eines Starmix homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Faltenfilter gedrückt und bei 35 000 g (30 Min.) zentrifugiert. Der klare, leicht gelb gefärbte Überstand wurde bei 80 000 g (120 Min.) zentrifugiert. Das anfallende Sediment wurde in einem geringen Volumen von Medium b (ohne Detergens) suspendiert. Die so erhaltene Ribosomen-suspension diente zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten der Cytoplasma-Ribosomen.

Ribosomen-Präparate aus grünen Blättern enthalten neben Cytoplasma-Ribosomen stets Chloroplasten-Ribosomen, da ein Aufplatzen der Chloroplasten während der Aufarbeitung des Blattmaterials bisher nicht zu vermeiden war.

Um ein solches Mischpräparat der Ribosomen zu erhalten, wurde der 1000 g-Überstand des Blatthomoge-

nats (s. Darstellung der Chloroplasten) bei 35 000 g (30 Min.) zentrifugiert und der sich hier ergebende Überstand bei 80 000 g (120 Min.) zentrifugiert. Das Sediment besteht aus Chloroplasten- und Cytoplasma-Ribosomen.

In gleicher Weise wurden die Ribosomen aus den Blüten von *Antirrhinum* isoliert.

Extraktion der Nucleinsäuren

Die Extraktion der Nucleinsäuren aus den Blättern, Wurzeln und Ribosomen-Präparaten erfolgte nach einer schon früher beschriebenen Methode¹.

Trennung der Nucleinsäuren

Die Trennung der Nucleinsäuren erfolgte an Säulen mit methyliertem Serumalbumin. Der schon früher beschriebene Trennungsgang¹ wurde insofern abgewandelt, als zur Elution der Nucleinsäuren nur ein Gradient verwendet wurde: 0,4-m. NaCl – 1,2-m. NaCl in 0,05-m. Phosphapuffer (pH 6,8).

Eine weitere Charakterisierung der Nucleinsäuren gelang durch ihre elektrophoretische Auftrennung in Polyacrylmidgel⁸. Zur Präparation eines 3,5-proz. Gels wurden in einem Erlenmeyer gemischt: 5,6 ml Acrylamid-Lösung (19 g Acrylamid und 1 g *N,N*-Methylenbisacrylamid in 100 ml H₂O), 2 ml Dimethylaminopropionitril (6,4% in H₂O) und 3,2 ml Puffer (108 g Tris, 9,3 g Dinatrium-EDTA, 55 g Borsäure in 1 l H₂O, pH 8,3 mit HCl eingestellt). Die Lösung wurde durch Zugabe von H₂O auf ein Volumen von 30 ml gebracht. Es wurden nun 2 ml Ammoniumpersulfat-Lösung (1,6% in H₂O) hinzugegeben, kurz geschüttelt und jeweils 2–3 ml dieser Lösung in eine Elektrophoresezelle des Acrylophors (Pleuger) gefüllt, in der die Polymerisation des Gels in 20–30 Min. abgeschlossen war. Der überschüssige Puffer wurde entfernt. Für die Elektrophorese wurden die zu prüfenden Nucleinsäurefraktionen in einem Tris-EDTA-Puffer, pH 8,3, gelöst (10,8 g Tris, 0,93 g EDTA, 5,5 g Borsäure und 5,58 g NaCl in 1 l H₂O). 1 ml der Nucleinsäurelösung wurde mit 1 ml einer 40-proz. Saccharoselösung, die 0,001-proz. an Bromphenolblau war, versetzt. Die Saccharose erhöhte die Dichte der Lösung und das Bromphenolblau ließ auf Grund seiner Wanderungsgeschwindigkeit im Gel wertvolle Rückschlüsse auf den Ablauf der Trennung der Nucleinsäuren zu: Das Bromphenolblau wanderte ungefähr so schnell wie die „leichteste“ Nucleinsäure, die säurelösliche RNS-Fraktion. 10 bis 20 μ l der Saccharose-Nucleinsäurelösung wurden über die senkrecht angeordneten Gele geschichtet. Bei 80 V und 5 mA pro Elektrophoresezelle benötigte die Trennung 60–70 Minuten. Anschließend wurde das Gel aus den Zellen herausgedrückt, 5 Min. in 1-n. Essigsäure gelegt und 10 Min. mit Methylenblau gefärbt (0,4-m. Na-Acetat, 0,4-m. Essigsäure, pH 4,7, versetzt zu 2% mit Methylenblau). Die überschüssige Farbe wurde unter fließendem Wasser ausgewaschen und die präparierten Gele photographisch protokolliert.

Bestimmung der Sedimentationskonstanten

Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten der Ribosomen erfolgte mit Hilfe einer Analytischen Ultrazentrifuge (Beckman). Die Ribosomensuspension (Ribosomen in Medium b) wurde in Standardzellen mit Kel-F-Zwischenstück (12 mm, 4°) bei 20 °C zentrifugiert. Bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 42040 UpM wurden in 2-Min.-Intervallen Aufnahmen gemacht (Schlierenoptik). Die Auswertung der Plattenaufnahmen erfolgte mit einem Meßmikroskop der Firma Zeiss.

Die angegebenen Sedimentationskonstanten beziehen sich auf unendlich verdünnte Lösungen.

In gleicher Weise erfolgte die Bestimmung der Sedimentationskonstanten der Nucleinsäuren, nur trat an die Stelle der Schlierenoptik die Absorptionsoptik der Ultrazentrifuge. Die Auswertung der Aufnahmen wurde schon früher beschrieben¹.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk sei für finanzielle Unterstützung dieser Untersuchungen, Fr. H. MATTHÄI für zuverlässige technische Assistenz herzlich gedankt.