

im Ultraviolett ein Absorptionsmaximum bei 326—327 m μ zeigte (Fig. 4). Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

C ₂₀ H ₃₀ O	Ber. C	83,83	H	10,58%
	Gef. „	83,39	„	10,26%

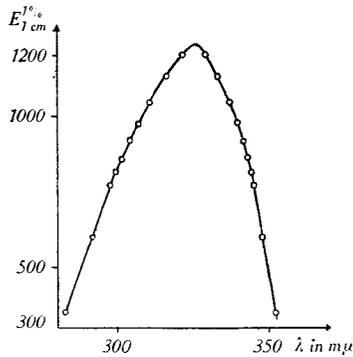


Fig. 4.

Substanz Z aus Vitamin A-Epoxyd.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

74. Studien zur Darstellung von γ -Globulin und dessen Komponenten von Ch. Wunderly.

(7. II. 47.)

Die komplexe Struktur der Serumproteine hat von zwei Seiten her eine neue Bestätigung erfahren. Einmal die Aussalzungskurven von *Roche, Derrien* und *Mandel*¹⁾ sowie *Derrien* (1946)²⁾. Dieselben haben durch entsprechend abgestufte Konzentrationen von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei p_H 6 und 37° die Serumproteine in 121 Fraktionen aufgetrennt. Werden die Punkte, welche sich aus diesen Löslichkeiten ergeben, in üblicher Weise auf einer Kurve vereinigt, so werden im Bereich der Albumine fünf und im Bereich der Globuline 7 Unstetigkeiten gefunden. Daraus folgt, dass die Fraktionen, wie sie mit analoger, wenn auch in weniger umfassender Weise *Butler* und Mitarb.³⁾, ferner *Kydd*⁴⁾ (1934) und *Richards*⁵⁾ (1938) erhalten hatten, nicht homogen

¹⁾ *Roche, Derrien* und *Mandel*, C. r. Soc. Biol. **138**, 515, 600, 634, 676, 677 (1944); **139**, 101 (1945), C. r. **220**, 572 (1945).

²⁾ *Derrien*, Bull. Soc. Chim. biol. **26**, 1091 (1944); Th. Sc. Marseille **1946**, 143.

³⁾ *Butler* und *Montgomery*, J. Biol. Chem. **99**, 173 (1932); *Butler, Blatt* und *Southgate*, J. Biol. Chem. **109**, 755 (1935).

⁴⁾ *Kydd, D. M.*, J. Biol. Chem. **107**, 747 (1934).

⁵⁾ *Richards, M. M.*, J. Biol. Chem. **122**, 727 (1938).

waren. Dieselbe Einsicht hat sich etwa gleichzeitig auf Grund der Elektrophorese der Serumproteine ergeben. Hier war es *Svensson*¹⁾ (1941), der erstmals im Pferdeserum 2 getrennt wandernde α -Globuline und ebenso 2 β -Globuline feststellte. Neuerdings gelang es *Wiedemann*²⁾ (1945—1946) durch verbesserte Optik, mittels Elektrophorese im menschlichen Serum 2 α -Globuline, 3 β -Globuline und 2 γ -Globuline zu unterscheiden.

Die daraus abgeleitete Einsicht, dass mit den stetig verbesserten Methoden die Auftrennung der Serumproteine immer weiter getrieben werden kann, hat auch in präparativer Hinsicht ihre Folgen gehabt. Während man längere Zeit angenommen hatte, dass Proteinfraktionen, die sich durch eine bestimmte Beweglichkeit im elektrischen Feld auszeichnen, auch chemisch homogen sind, haben *Cohn*³⁾ und Mitarb. bewiesen, wie das elektrophoretisch isolierte γ -Globulin sich in 2 Fraktionen spaltet, wenn man es der Dialyse unterwirft. Es ist somit auch dieser Weg nicht geeignet, um in einfacher Weise zu homogenen Fraktionen zu gelangen. Dazu kommen die bedeutenden Schwierigkeiten, welche alsbald auftreten, wenn versucht wird, durch Elektrophorese Proteinfraktionen in Mengen zu isolieren, die nicht nur für mikroanalytische Zwecke genügen (vgl. *Svensson*⁴⁾, 1942, 1946), wie etwa Gehaltsbestimmungen an Cholesterin, Phospholipoiden, Fettsäuren, Kohlehydraten etc., sondern für eigentlich präparative Ziele. Für die Belange der klinischen Chemie, etwa zur Beeinflussung der Abwehrkraft gegen bakterielle Infektion oder als haemostatische Mittel bei Blutungen, bildet die fraktionierte Fällung der Proteine, sei es durch Neutralsalze (Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Kaliumcitrat, Dikaliumhydrogen- und Kaliumdihydrogenphosphat), sei es durch Ausfrieren in Äthanol-Wasser-Mischungen (vgl. *Cohn* und Mitarb. 1946)⁵⁾ den am besten geeigneten Weg. Zur Prüfung der erreichten Einheitlichkeit ist es alsdann besonders vorteilhaft, die einzelnen Fraktionen durch anschliessende Elektrophorese zu analysieren.

Von dieser Möglichkeit der Kontrollanalyse hat die Bostoner Arbeitsgruppe unter *E. Cohn*⁶⁾ vielfachen Gebrauch gemacht. Dabei hat sich herausgestellt, dass den Fraktionen, wie sie durch ihre Beweglichkeiten im elektrischen Feld definiert sind, ganz bestimmte biologische Funktionen zukommen; d. h. die Mitwirkung bestimmter Proteine, etwa bei den Gerinnungsvorgängen des Blutes oder im Verlaufe einer Immunisation, lässt sich durch Elektrophorese genauer

¹⁾ *Svensson, H.*, J. Biol. Chem. **139**, 805 (1941).

²⁾ *Wiedemann, E.*, Schweiz. med. Wschr. **75**, 229 (1945); **76**, 241 (1946).

³⁾ *Cohn, E., Mc. Meekin, Oncley, Newell und Hughes*, Am. Soc. **62**, 3386 (1940).

⁴⁾ *Svensson, H.*, Ark. Kem. **15 B** Nr. 19 (1942); **22 A**, Nr. 10 (1946).

⁵⁾ *Cohn, E., Strong, Hughes, Mulford, Ashworth, Melin und Taylor*, Am. Soc. **68**, 459 (1946).

⁶⁾ *Cohn, E., Oncley, Strong, Hughes und Armstrong*, J. Clin. Invest. **23**, 417 (1944).

umschreiben als durch die Angaben der entsprechenden Löslichkeitsgrenzen. Daraus ist das Bedürfnis entstanden, entweder Fällungen vorzunehmen, welche die α -, β - oder γ -Globuline möglichst rein auszusalzen, oder sonstige Anreicherungsverfahren zu entwickeln, welche es gestatten, die gefällten Fraktionen so zu reinigen, dass sie möglichst viel des angestrebten α -, β - oder γ -Globulins enthalten. Nachdem sich gezeigt hat, dass Proteinfractionen immer nur homogen erhalten werden können in bezug auf die Methode ihrer Isolierung, verzichtet man grundsätzlich auf die Isolierung von Proteinfractionen, welche chemisch homogen sind, und strebt statt dessen die Homogenität im biologischen Sinne an. An Stelle der chemischen Einheitlichkeit der Plasmaproteine, welche sich vorläufig noch nicht verwirklichen lässt, tritt als massgebliche Grösse die biologische Funktion.

Das Proteingemisch_[33] aus dem Blutserum von Mensch, Pferd, Rind und Maultier.

Wird ein Blutserum mit soviel gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt, dass die Endkonzentration 33% ausmacht, dann wird ein Proteingemisch ausgesalzen, welches *Soerensen* mit Globulin_[33] bezeichnete. Wie unsere nachstehenden Daten erkennen lassen, werden jedoch nicht nur Globuline ausgefällt, sondern auch ein gewisser Teil der Albumine. Um dies festzustellen, boten die früheren analytischen Methoden keine hinreichend genaue Messmöglichkeit. Nachdem sich aber mit der Elektrophorese zeigen lässt, dass z. B. im menschlichen Serum bis zu 23% Albumine mitausgefällt werden, ist es richtiger, von einem Proteingemisch_[33] zu sprechen. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit dem Fällungsvermögen des neu entwickelten Cadmium-Reagens (*Wunderly* und *Wuhrmann*)¹); da dasselbe ausschliesslich Trübungen gibt in krankheitshalber veränderten Sera und in denselben die grobdispersen Anteile zumeist erhöht sind, war die Annahme naheliegend, dass das Reagens Globuline zur Aussalzung bringt. Allein die Elektrophorese von Serumresten nach abgestuften Fällungen mit CdSO_4 zeigte uns, dass nicht nur Globuline, sondern stets ein Gemisch von Albumin und Globulin ausgefällt werden. Im $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wie im CdSO_4 ist in erster Linie das Anion für den aussalzenden Effekt verantwortlich, und deshalb eine analoge Wirkung zu erwarten.

Um die Wechselwirkung sichtbar zu machen, wie sie zwischen Ausgangsserum und Proteingemisch_[33] besteht, geben wir nachfolgend je 2 charakteristische Elektrophorese-Analysen von normalem Serum vom Mensch (ausgewählt aus 10 Untersuchungen), Pferd (8), Rind (6) und Maultier (5).

¹) *Wunderly* und *Wuhrmann*, Exper. 2, Heft 8 (1946); Schweiz. med. Wschr. 75, 1128 (1945).

Die vorbereitende Dialyse der Sera sowie die technische Durchführung der Elektrophorese sind von *Wiedemann* (l. c.) letztthin beschrieben worden. Die in der Schweiz gebaute Elektrophorese-Apparatur (*Strübin & Co.*, Basel) ist abgebildet (s. *Wunderly*)¹⁾ und mit Einrichtung zur Basisreduktion versehen. Um von den Tiersera klare Diagramme zu erhalten, war es notwendig, die Tiere während der 20 Stunden, welche der Blutentnahme vorausgehen, fasten zu lassen. Dadurch gelingt die notwendige Reduktion des Serumfettgehaltes. Als Puffer diente der kochsalzhaltige Veronal-Natrium/Natriumacetat-HCl-Puffer von *L. Michaelis*²⁾ mit der Einstellung auf p_H 7,9 und $\mu = 0,1$; die Spannung lag zwischen 3,60 und 3,73 Volt/cm; die Temperatur betrug 3° C und die Versuchszeit zwischen 7500 und 8100 Sek. Die Diagramme der Fig. 1 zeigen „descending boundaries“ mit der Wanderungsrichtung von rechts nach links. Die kathodische Beweglichkeit u ist angegeben in $(cm/Sek \times Volt) \times 10^5$. Für die Aussalzung wurde das Serum/ $(NH_4)_2SO_4$ -Gemisch für 16 Stunden in den Thermostaten von 25° gestellt und oft kräftig aufgerührt. Das p_H wurde mit Acetat auf 7 gebracht.

Tabelle 1.
Auswertung von Elektrophorese-Diagrammen.

Blutserum	rel. %	abs. %	u	rel. %	abs. %	u	
Mensch . . Alb.	67,4	4,65	8,49	65,1	4,75	8,22	
Globulin . {	α	3,8	6,11	6,1	0,44	6,02	
	β	11,5	4,83	12,3	0,90	4,71	
	γ	17,3	1,20	2,05	16,5	1,21	1,97
			6,90%		7,30%		
Pferd . . . Alb.	40,9	2,86	8,44	37,6	2,37	8,57	
Globulin . {	α	15,0	1,05	6,78	14,3	0,90	6,81
	β_1	15,9	1,11	5,26	14,7	0,93	5,33
	β_2	6,4	0,45	3,89	7,4	0,44	4,09
	γ	21,8	1,53	2,67	26,4	1,66	2,79
		7,00%		6,30%			
Rind. . . . Alb ₁	45,2	2,89	9,54	42,1	2,82	9,31	
Alb ₂	6,1	0,39	8,23	5,8	0,39	8,39	
Globulin . {	α_1	9,2	0,59	7,07	8,7	0,58	6,94
	α_2	3,1	0,20	6,10	3,0	0,20	6,27
	β_1	9,2	0,59	5,24	10,3	0,69	5,11
	β_2	15,8	1,01	4,07	13,0	0,87	4,34
	γ_1	7,7	0,49	2,03	γ 17,79	1,15	1,96
	γ_2	3,7	0,24	1,70		6,70%	
		6,40%					
Maultier. . Alb.	47,6	3,14	8,52	51,0	3,16	8,45	
Globulin . {	α	10,8	0,71	6,49	10,8	0,67	6,56
	β	20,0	1,32	5,13	12,6	0,78	4,98
	γ	21,6	1,43	2,64	25,6	1,59	2,71
		6,60%			6,20%		

1) *Wunderly*, Vjschr. Naturf. Ges. Zürich **91**, 197 (1946).

2) *Michaelis*, Bioch. Z. **234**, 139 (1931).

Aus den Gehaltsangaben der Tabelle 1 geht hervor, dass sich das menschliche Serum von den Tiersera hauptsächlich durch seinen höheren Albumingehalt auszeichnet. Derselbe nimmt durchschnittlich ab in der Reihenfolge Mensch > Maultier > Rind > Pferd, was eine Bestätigung darstellt der 1944 hier gezeigten Aussalzungskurven (*Wunderly*¹⁾). Die Untersuchungsreihe hat ferner ergeben, dass der Gehalt an einzelnen Fraktionen von Individuum zu Individuum beträchtlich schwankt, womit wir die Auffassung von *H. Svensson*²⁾ bestätigen können. Dagegen erweisen wiederholte Kontrollen, dass der einzelne Organismus die Zusammensetzung seiner Serumproteine bemerkenswert konstant erhält. Insofern bestehen bei den Serumproteinen dieselben Gegebenheiten wie sie *W. R. Bloor*³⁾ bei den Lipoiden des Blutsersums festgestellt hat.

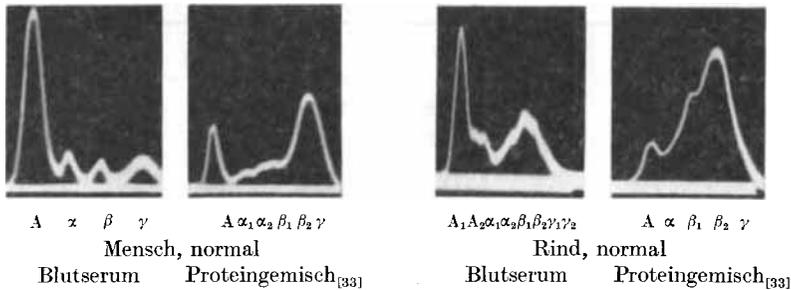


Fig. 1.
Elektrophoresediagramme

Tabelle 2.

	Verhältniszahlen zum Albumingehalt		
	α	β	γ
<i>Svensson, H.</i> , Koll. Z. 87 , 181 (1939)	0,13	0,26	0,17
<i>Longworth, L. G.</i> , J. Exp. Med. 70 , 399 (1939) . . .	0,12	0,23	0,20
<i>Luetscher, J. A.</i> , J. Clin. Invest. 19 , 313 (1940); 20 , 315 (1941)	0,11	0,21	0,19
<i>Scudder, Ann. Surg.</i> 112 , 502 (1940)	0,10	0,18	0,17
<i>Moore, D. H.</i> , und <i>Lynn, J.</i> , J. Biol. Chem. 141 , 819 (1941)	0,13	0,22	0,19
<i>Gutmann, J. et al.</i> , J. Clin. Invest. 20 , 765 (1941); 20 , 788 (1941)	0,12	0,21	0,27
<i>Taylor und Keys</i> , J. Biol. Chem. 148 , 379 (1943) . . .	0,10	0,21	0,21
<i>Deutsch und Goodloe</i> , J. Biol. Chem. 161 , 1 (1945) . .	0,26	0,18	0,15
<i>Olhagen, B.</i> , Acta Med. Scand., Suppl. 162 (1945) . .	0,12	0,25	0,35
<i>Wiedemann, E.</i> , Schweiz. med. Wschr. 74 , 566 (1944); 76 , 241 (1946)	0,08	0,13	0,21
Eigene Untersuchungen	0,09	0,17	0,23
Durchschnittliche Verhältniszahlen . . .	0,123	0,205	0,213

¹⁾ *Wunderly*, Helv. **27**, 417 (1944). ²⁾ *Svensson*, Ark. Kem. **22 A**, Nr. 10, 135 (1946).
³⁾ *Bloor*, Biochemistry of the Fatty Acids (New York, 1943), S. 131.

Zu Vergleichszwecken hat es sich als nützlich erwiesen, die Gehalte der Globulinunterfraktionen des normalen menschlichen Serums in das Verhältnis zu setzen vom Albumingehalt. Auf diese Weise geben wir in Tab. 2 den Durchschnittsgehalt von 10 untersuchten menschlichen Sera, neben den Ergebnissen von 10 weiteren Untersuchern.

Zu der Vergleichbarkeit der einzelnen Untersuchungsreihen ist zu bemerken, dass nicht alle Elektrophoresen unter denselben Bedingungen vorgenommen wurden. So schwanken die verwendeten p_H -Werte zwischen 7,4 und 8,6; die Temperatur zwischen 1° und 4°; die Ionenstärke μ zwischen 0,1 und 0,2; als Puffersystem wurde etwa gleich oft Phosphat (*Soerensen*) wie Veronal-Acetat (*Michaelis*) angewandt. In Anbetracht der verschiedenen Messverhältnisse darf die Übereinstimmung als gut bezeichnet werden; ebenso sei mit Befriedigung vermerkt, dass es der Schweiz 1944 gelungen ist, sich in diese Reihe einzuschalten.

Tabelle 3.

Auswertung von Elektrophorese-Diagrammen von Proteingemischen_[33].

Proteingemisch _[33]	rel. %	abs. %	u	rel. %	abs. %	u	
Mensch . . Alb.	18,3	1,22	9,86	23,4	1,54	9,41	
Globulin .	α_1	2,0	0,13	8,27	2,2	0,14	8,11
	α_2	4,5	0,30	7,41	5,6	0,37	7,07
	β_1	6,4	0,43	6,22	7,0	0,46	6,20
	β_2	6,7	0,45	5,19	5,8	0,38	5,09
	γ	62,1	4,17	2,52	56,0	3,71	2,13
		6,70%			6,60%		
Pferd . . . Alb.	8,6	0,64	9,55	7,4	0,51	9,80	
Globulin .	α_1	1,3	0,09	7,69	1,4	0,10	8,07
	α_2	6,3	0,46	6,90	5,9	0,41	7,27
	β_1	4,7	0,38	6,07	5,5	0,38	6,03
	β_2	22,5	1,66	5,30	24,7	1,70	5,44
	γ	56,6	4,17	1,99	55,1	3,80	2,23
		7,40%			6,90%		
Rind. . . . Alb.	9,8	0,75	8,18	8,2	0,60	9,01	
Globulin .	α	9,8	0,75	6,16	9,1	0,66	6,98
	β	37,0	2,85	4,49	β_1 14,3	1,04	5,51
					β_2 25,1	1,83	4,60
	γ	43,4	3,35	2,82	43,3	3,17	2,14
		7,70%			7,30%		
Maultier . Alb.	2,7	0,21	9,77	5,2	0,34	9,51	
Globulin .	α	11,3	0,89	7,39	11,7	0,76	7,22
	β_1	15,1	1,18	5,54	16,8	1,09	5,40
	β_2	13,5	1,05	3,87	12,2	0,79	3,66
	γ_1	27,0	2,11	2,64	γ 54,1	3,52	1,91
	γ_2	30,4	2,36	1,84			
			7,80%			6,50%	

In Tab. 3 befinden sich die Auswertungen von je 2 Elektrophorese-Diagrammen von Proteingemischen_[33], ausgesalzen aus dem Serum von Mensch, Pferd, Rind und Maultier. In Fig. 1 ist je ein charakteristisches Diagramm von Mensch und Rind abgebildet.

Die stets bei 25° ausgesalzenen Proteingemische_[33] wurden abzentrifugiert, in dest. Wasser zu 7—8-proz. Lösung aufgenommen, während 12 Stunden gegen fließendes Wasser und darauf in üblicher Weise gegen *Michaelis*-Puffer dialysiert. Alle übrigen Daten wie vorn.

Die Auswertungen zeigen, dass die Aufteilung des Diagrammes in deutlich einzeln wandernde Fraktionen beim Proteingemisch_[33] des Rindes verhältnismässig einfach ist, obwohl das Rinderserum seinerseits eine starke Aufteilung zeigt (vgl. Tab. 1). Es wird somit keine einfache Abhängigkeit sichtbar zwischen Serumzusammensetzung und Aussalzungseffekt. Einzig der Albumingehalt, der im menschlichen Serum am grössten ist, ist es ebenfalls im Proteingemisch_[33] dieses Serums.

Der Einfluss der Temperatur auf die Zusammensetzung des Proteingemisches_[33].

Derselbe wurde untersucht, um die optimale Temperatur kennenzulernen, bei welcher der Gehalt des Proteingemisches_[33] an γ -Globulin am grössten ist. Dazu wurden drei gleich grosse Portionen eines Pferdeserums auf die Temperaturen 5°, 25° und 37,5° gebracht und alsbald soviel gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung von entsprechender Temperatur zugegeben, dass die Endkonzentration 33% ausmacht. Nach Neutralisation mit Acetat auf pH 7 wurden die Gemische für 16 Stunden bei diesen Temperaturen gehalten. Anschliessend wurde scharf abzentrifugiert und der Proteinniederschlag in soviel Wasser aufgenommen, dass ein ca. 8-proz. Sol entstand. Dasselbe wurde erst gegen fließendes Wasser, dann gegen *Michaelis*-Puffer dialysiert und schliesslich der Elektrophorese unterworfen. Dieselbe dauerte jeweils 8100 Sekunden, alle übrigen Daten gleich wie vorn.

Tabelle 4.

Proteingemisch _[33] , (Pferdeserum)	Ausgefällt bei						
	5°		25°		37,5°		
	rel. %	abs. %	rel. %	abs. %	rel. %	abs. %	
Albumin . . {	A ₁	2,5	0,20				
	A ₂	10,8	0,86	6,5	0,54	9,5	0,77
Globulin . . {	α	9,0	0,72	6,6	0,55	5,0	0,40
	β_1	9,5	0,76	8,2	0,69	7,1	0,57
	β_2	13,3	1,06	15,3	1,28	19,0	1,54
	γ	54,9	4,40	63,4	5,34	59,4	4,82
			8,00%		8,40%		8,10%

Die Verschiedenheit der Fällungstemperatur verändert die Dissoziation der verschiedenen freien Gruppen in den Seitenketten der Proteine, ferner die Kräfte, welche wirksam sind zwischen Proteinteilchen im festen Zustand und den hydratisierten Proteinteilchen in der Lösung, schliesslich die verschieden stark lösende wie fällende

Wirkung der 33-proz. Salzlösung. Während in verdünnten Salzlösungen die Löslichkeit der Proteine mit erhöhter Temperatur im allgemeinen zunimmt, erweist sich hier in Gegenwart der konzentrierten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung 25° als optimale Temperatur. Bei 5° wie bei $37,5^\circ$ wird weniger Protein gefällt, und zwar hauptsächlich γ -Globulin. Albumin dagegen fällt bei 5° und $37,5^\circ$ stärker aus als bei 25° .

Das Albuminteilchen besitzt besonders viele polare Gruppen, nämlich etwa je 90—100 negativ und positiv geladene Gruppen. Da diese in regelmässiger Weise über die Teilchenoberfläche verteilt sind, besitzt es nur ein kleines Dipolmoment; so hat in Wasser gelöstes Serum-Albumin (Pferd) bei 25° ein Dipolmoment von 380 *Debey*-Einheiten gegenüber dem γ -Pseudoglobulin (Pferd) mit 1100 *Debey*-Einheiten (aus *E. J. Cohn* und *J. T. Edsall*)¹⁾. Diese grossen Unterschiede in der Ladungsverteilung lassen uns vermuten, dass die beobachteten Löslichkeitsunterschiede von Albumin und γ -Globulin bei 5° , 25° und $37,5^\circ$ nicht so sehr bedingt sind durch Eigenschaftsänderungen der einzelnen Teilchen als vielmehr durch die verschieden starke Bildung grösserer Protein-Assoziate zwischen Albumin und γ -Globulinteilchen. Was somit zur Messung gelangt, dürfte die temperaturbedingte Wechselwirkung der genannten Fraktionen sein. Es sei erinnert, dass auch *Butler* und Mitarb.²⁾ die Temperatur von 25° fällungstechnisch als optimal betrachten. Wir können dies bestätigen und erkennen zudem, dass bei dieser Temperatur die relativ grösste Menge an γ -Globulin ausgesalzen wird.

Die Darstellung von Globulin_[33].

Der nächste Schritt zur Reindarstellung des γ -Globulin_[33] bestand in der Elimination des Albumin-Anteiles, wie er im Proteingemisch_[33] noch vorhanden ist. Dafür wurden die folgenden drei Möglichkeiten geprüft. Einmal war zu untersuchen, ob durch Behandlung mit negativ geladenen Suspensionen von $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder $\text{Mg}(\text{OH})_2$ eine selektive Adsorption der leicht dispersen Anteile des Proteingemisches_[33] erreichbar ist. Seit *Bordet*³⁾ (1920), ist bekannt, dass auf diese Weise aus Oxalat-Plasma Prothrombin adsorbiert wird. Seither konnte gezeigt werden, dass Prothrombin grösstenteils zum α -Globulin gerechnet werden muss (*Orr* und *Moore*⁴⁾, *Cohn* et al.⁵⁾), da es in gereinigter Form bei p_H 8 eine elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von $u = 7,6$ besitzt (*Seegers* et al.)⁶⁾.

1) *Cohn* und *Edsall*, *Proteins, Amino Acids and Peptides* (New York, 1943).

2) *Butler*, *Blatt* und *Southgate*, *J. Biol. Chem.* **109**, 755 (1935); *Butler* und *Montgomery*, *J. Biol. Chem.* **99**, 173 (1933).

3) *Bordet*, *Ann. Inst. Pasteur* **34**, 561 (1920).

4) *Orr* und *Moore*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **46**, 357 (1941).

5) *Cohn*, *Onclay*, *Strong*, *Hughes* und *Armstrong*, *J. Clin. Invest.* **23**, 417 (1944).

6) *Seegers*, *Loomis* und *Vandenbelt*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **56**, 70 (1944).

Für die Herstellung der Suspension folgen den Angaben von *Astrup* und *Darling*¹⁾. Zu 100 cm³ einer 10-proz. Lösung von wasserfreiem CaCl₂ werden 100 cm³ einer 10-proz. Lösung von Trinatriumphosphat gegeben und durch Umschwenken gut gemischt. Nach 2 Minuten wird zentrifugiert, die überstehende Lösung abgegossen und das Sediment je dreimal auf der Zentrifuge mit destilliertem Wasser und NaCl physiol. gewaschen. Darauf wird das rein weisse Sediment in 80 cm³ NaCl physiol. gleichmässig suspendiert.

Inzwischen wurde aus menschlichem Serum in üblicher Weise durch Salzfällung das Proteingemisch_[33] gewonnen. Dasselbe wird in destilliertem Wasser zu einer 8-proz. Lösung aufgenommen und 12 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Flocken von ausgefallenem, grobdisperssem Protein werden mit einigen Körnchen Kochsalz wieder peptisiert. Mit 100 cm³ des Proteinsols werden 25 cm³ der frischen Suspension gut vermischt und mit einigen Tropfen 0,1-n. HCl auf p_H 7 neutralisiert. Die Aufschlammung wird 15 Minuten gerührt, zentrifugiert und vom Bodensatz das Proteinsol abgegossen. Das Sol wird erneut mit 25 cm³ der Suspension während 15 Minuten gerührt und durch Zentrifugieren getrennt. Die Adsorption wird ein drittes Mal mit den restlichen 30 cm³ der Suspension wiederholt. Nachdem 1 Stunde gerührt wurde, zentrifugiert man ab, dialysiert erst 12 Stunden gegen fließendes Wasser, darauf 3 Tage im Eisschrank gegen öfters erneuerten *Michaelis*-Puffer vom p_H 7,9. Das Ergebnis der anschliessenden Elektrophorese ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Um darzutun, wie die Adsorption sich auf die einzelnen Proteinfractionen verteilt, sind die Gehaltsdifferenzen in relativen Prozenten aufgeführt, gegenüber dem unvorbehandelten Proteingemisch_[33].

Als weitere Möglichkeit der Anreicherung von γ -Globulin aus dem Proteingemisch_[33] haben wir dasselbe nach *E. Cohn*²⁾ mit einer Äthanol-Wasser-Mischung bei -5° gefällt. Der Vorteil dieser Methode beruht darin, dass bei Temperaturen von 0° bis -10° Proteine durch Alkohol nicht denaturiert werden und die Dialyse überflüssig wird. *Cohn* hat gezeigt, wie man Proteine aus dem gefrorenen Zustand unmittelbar im Vakuum trocknen kann, so dass stabile, hochgereinigte Produkte entstehen.

Um der kriegbedingten Nachfrage nach einzelnen Proteinfractionen genügen zu können, wurde diese Methode in Boston u. a. als eigentlicher Fabrikationsprozess aufgezogen.

Dementsprechend haben wir ein gegen Wasser audialysiertes Proteingemisch_[33] aus menschlichem Serum, mit Acetat-Puffer von $\mu = 0,2$ auf p_H 6,7 gebracht und mit Wasser soweit verdünnt, dass der Proteingehalt 6,0% beträgt. Der Erlenmeyerkolben, in welchem sich die 120 cm³ Proteinsol befinden, steht in einer Kältemischung, so dass die Temperatur des Sols -5° beträgt. Nun wird ein elektrisch betriebener Rührer eingeschaltet und aus einem Scheidetrichter allmählich 53 cm³ vorgekühltes Äthanol von 53,3% zugetropft. Nach 2 Stunden bei -5° wird die Proteinfällung in der eisgekühlten Zentrifuge abgeschleudert, in soviel destilliertem Wasser aufgenommen, dass ein 7,5-proz. Sol entsteht und in üblicher Weise gegen *Michaelis*-Puffer dialysiert. Die Auswertung des Elektrophorese-Diagrammes steht in Tabelle 5.

Als dritter Weg wurde das Proteingemisch_[33] dem peptischen Abbau ausgesetzt. Wie wir zeigen konnten (*Wunderly*)³⁾ wird dabei in erster Linie das Albumin betroffen, so dass auch in dieser Weise eine Anreicherung der grobdispersen Anteile erfolgen kann.

¹⁾ *Astrup* und *Darling*, Acta Physiol. Scand. **4**, 45 (1942).

²⁾ *Cohn*, Medecine **24**, 333 (1945); *Cohn, Strong, Hughes, Mulford, Ashworth, Melin* und *Taylor*, Am. Soc. **68**, 459 (1946).

³⁾ *Wunderly*, Nature **158**, 556 (1946).

Dazu werden 40 cm³ einer dialysierten, 8-proz. Lösung von Proteingemisch_[33] mit 10 cm³ *Michaelis*-Puffer von p_H 4,9 versetzt. Das Sol wird auf 37° erwärmt und unter stetigem Rühren soviel Pepsin (*Fairchild*) zugegeben, dass das Verhältnis von Pepsin zu Protein wie 1:9 ist. Nach 15 Minuten wird durch Zugabe von entsprechendem *Michaelis*-Puffer das p_H auf 7,9 gebracht und bei 2° gegen *Michaelis*-Puffer von demselben p_H dialysiert. Die Daten der Elektrophorese sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5.

Auswertung von Elektrophorese-Diagrammen für Verfahren zur Darstellung von Globulin_[33].

Protein- fraktion	Adsorption		Abnahme in % der Fraktion	Fällung durch Äthanol		Abbau durch Pepsin	
	rel. %	abs. %		rel. %	abs. %	rel. %	abs. %
Albumin	17,9	1,38	3,2	—	—	—	—
Glo- bu- lin	α_1	1,4	0,11	17,6	—	2,9	0,20
	α_2	4,0	0,31	18,3	2,5	0,19	6,5
	β_1	4,2	0,32	14,3	9,2	0,71	8,2
	β_2	6,7	0,51		5,1	0,39	18,0
γ	65,8	5,07		83,2	6,43	64,4	4,51

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, führt die Adsorption an einer Ca₃(PO₄)₂-Suspension nicht zum Ziel. Die leicht dispersen Anteile des Proteingemisches nehmen zwar beträchtlich ab, jedoch wollte es nicht gelingen, den Rest von Albumin zu eliminieren, weder durch erhöhten Gehalt an adsorbierender Suspension noch durch andere Adsorbentien, wie BaSO₄, Al(OH)₃ oder Mg(OH)₂. Auf die Einzelgehalte der Unterfraktionen berechnet, ergibt sich eine Zunahme der Adsorption in der Reihenfolge Albumin < β_1 < α_1 < α_2 während β_2 - und γ -Globulin unter den angegebenen Bedingungen nicht messbar adsorbiert werden. Es ist denkbar, dass durch entsprechende Variation des p_H die adsorptiven Eigenschaften der Suspension so geändert werden können, dass eine andere Selektion von Proteinfractionen eintritt. Als Kontrollanalyse solcher Vorgänge, wo ungefärbte, hochmolekulare Substanzen beteiligt sind, eignet sich die Elektrophorese vorzüglich.

Die Äthanol-Fällung eliminiert das Albumin vollständig, denn im Niederschlag befinden sich nur noch die Unterfraktionen α_2 , β_1 , β_2 und γ , dieses letztere auch besonders hoch angereichert, nämlich 83,2%. Von dem im Proteingemisch_[33] befindlichen γ -Protein werden 87% wiedergefunden. *Deutsch et al.*¹⁾ sind von den *Cohn*'schen Fraktionen II + III ausgegangen und haben bei p_H 5,1 und einer Äthanol-Konzentration von 17% bei -6°, $\frac{3}{4}$ der γ -Fraktion in einer Reinheit von ca. 95% isolieren können.

Beim peptischen Abbau wird das Albumin quantitativ hydrolysiert. Das zeitliche Fortschreiten der Proteolyse haben wir nach

¹⁾ *Deutsch, Gosting, Alberty und Williams, J. Biol. Chem. 164, 109 (1946).*

*Krijgsman*¹⁾ verfolgt. Vom ursprünglichen γ -Protein werden 71% wiedergefunden. Die Proteolyse wird nicht beim optimalen p_H vorgenommen, weil es sich gezeigt hat, dass beim Unterschreiten des isoelektrischen Punktes von Albumin, p_H 4,6, bei der nachfolgenden alkalischen Pufferung auf p_H 7,9 irreversible Trübungen entstehen, welche klare Diagramme verunmöglichen.

In der Absicht, immunologisch aktive Fraktionen von inaktivem Begleitprotein zu befreien, haben *Deutsch et al.*²⁾ die *Cohn'sche* Fraktion III-1 der Pepsin-Hydrolyse unterworfen. Bei p_H 3,6 und 0—2° haben sie ein Endprodukt erhalten, das zu 88% aus γ , 10% β_2 und 2% β_1 besteht. Nach *M. Petermann*³⁾ spaltet Pepsin die Globulinteilchen vorerst in zwei Hälften; diese sind noch gross genug, um im elektrischen Feld gleich rasch zu wandern wie die ursprünglichen Globuline, erst die nochmalige Spaltung in Viertelsteile hat die Bildung von Bruchstücken zur Folge, welche hohe Diffusionsraten besitzen und deshalb, auch bei verlängerter Elektrophorese, keine eigenen Schlieren mehr ausbilden. Es ist bei p_H 7,9 nie beobachtet worden, dass Pepsin sich mit γ -Globulin zu einer neuen Komponente verbindet, die ihrerseits einen neuen Gipfel im Schlierendiagramm bedingen müsste. Für die elektrophoretische Kontrolle der Proteolyse ist Pepsin auch deshalb günstig, weil es keine Aktivatoren erfordert, deren Nebenwirkung auf Proteine oder Spaltstücke unerwünscht wäre. Beim peptischen Abbau von Lösungen kristallisierten Ovalbumins haben *Tiselius et al.*⁴⁾ gefunden, dass das nicht-abgebaute Protein seine physikalisch-chemischen Eigenschaften unverändert beibehält. Da auch die Sedimentationsgeschwindigkeit gemessen wurde, so hätten nach *Petermann* halbierte Proteinteilchen gefunden werden müssen. *Tiselius* beobachtete jedoch einen raschen Abbau zu niedrig-molekularen Teilchen von ca. 1000 Mol. Gew. Wie er es bezeichnet, handelte es sich um den „alles oder nichts“-Reaktionstypus. Die Verschiedenheit der Auffassung zeigt, dass weitere Untersuchungen über die Reaktionskinetik notwendig sind, wobei solche Untersucher die grössten Möglichkeiten besitzen welche gleichzeitig verschiedene physikalisch-chemische Messgrössen während der Proteolyse beobachten können. Die Forschungen von *Bergmann* und Mitarbeiter⁵⁾ haben ergeben, dass die Spezifität der proteolytischen Enzyme nicht durch die Kettenlänge der Substratmolekel bestimmt wird, sondern durch die Gruppen der Seitenketten und deren relative Stellung zur Peptidbindung, welche gelöst wird. Dabei wurden als notwendige Bausteine der Seitenkette Tyrosin und Phenylalanin erkannt. Da die Gehalte an diesen aromatischen Aminosäuren im menschlichen Blutplasma im Albumin 4,9% und 7,6% und im γ -Globulin 7,1% und 4,4% betragen, genügen die vorläufigen Erkenntnisse noch nicht, um zu erklären, warum Albumin soviel rascher von Pepsin hydrolytisch gespalten wird wie γ -Globulin.

Die Darstellung von γ -Globulin.

Da uns aus technischen Gründen die routinemässige Äthanol-Fraktionierung in der Kälte nicht möglich ist, versuchten wir durch Mehrfach-Fällung mit $(NH_4)_2SO_4$ ein γ -Globulin von der gewünschten Reinheit zu erhalten. Wie wir uns durch elektrophoretische Kontrollanalyse überzeugten, genügt hiefür eine wiederholte Fällung noch nicht (vgl. *H. Svensson*)⁶⁾. Wir haben deshalb den folgenden Weg eingeschlagen:

¹⁾ *Krijgsman*, Z. physiol. Ch. **227**, 251 (1934).

²⁾ *Deutsch, Petermann und Williams*, J. Biol. Chem. **164**, 93 (1946).

³⁾ *Petermann*, Soc. **68**, 106 (1946); J. Phys. Chem. **46**, 183 (1942).

⁴⁾ *Tiselius und Eriksson-Quensel*, Biochem. J. (London) **33**, 1752 (1939).

⁵⁾ *Bergmann und Fruton*, Adv. in Enzymol. **1**, 63 (1941).

⁶⁾ *Svensson*, J. Biol. Chem. **139**, 805 (1941).

Zu 50 cm³ normalem menschlichem Serum wurden bei 25° 25 cm³ vorgewärmte 33-proz. (NH₄)₂SO₄-Lösung unter Rühren zugegeben und nach Neutralisation mit Acetat, für 16 Stunden bei 25° in den Thermostaten gestellt. Alsdann wird scharf abzentrifugiert und das ausgefallene Protein in soviel destilliertem Wasser aufgenommen, dass das Sol 16 cm³ ausmacht. Dasselbe wird 2 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert, wobei das Volumen etwas zunimmt. Um vergleichbare Verhältnisse zu schaffen, wird mit destilliertem Wasser auf 20 cm³ aufgefüllt, auf 25° vorgewärmt und mit 10 cm³ 33-proz. (NH₄)₂SO₄ neuerdings gefällt. Nach 6 Stunden bei 25° wird abzentrifugiert, das Protein in 12 cm³ destilliertem Wasser aufgenommen und mit 6 cm³ 33-proz. (NH₄)₂SO₄ ein drittes Mal gefällt. Nach 3 Stunden bei 25° wird zentrifugiert, das Protein in 8 cm³ destilliertem Wasser aufgenommen und 2 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert. Man erhält auf diese Weise ein Sol, dessen Gehalt an γ -Globulin etwa 2,5–3,0% beträgt, wobei die Reinheit (siehe Tabelle 6) nahezu 98% erreicht. Nachdem die ursprünglichen 50 cm³ Serum bei einem mittleren Gehalt von 7% Protein zwischen 0,50 und 0,65 g γ -Globulin enthalten, werden davon etwa 35–45% in reiner Form isoliert (siehe Fig. 2).

Die Komponenten des γ -Globulins.

Wie vorn erwähnt, haben *Cohn* et al. (l. c.) das γ -Globulin durch Dialyse in 2 Komponenten zerlegt, die stark abweichende Löslichkeiten besitzen. Um die Zusammensetzung dieser Komponenten kennenzulernen, haben wir sie der Elektrophorese unterworfen.

Dazu werden 20 cm³ einer 2,9-proz. Lösung von reinem γ -Globulin (aus menschlichem Serum) erst 20 Stunden gegen fließendes Wasser von 5° und anschliessend 4 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die unlösliche Komponente vom Euglobulin-Typus fällt aus, wird abzentrifugiert und zur Elektrophorese in soviel *Michaelis*-Puffer von p_H 4 und $\mu = 0,1$ aufgenommen, dass die Lösung 2,8% Protein enthält. Im üblichen Puffer von p_H 7,9 ist diese Komponente nahezu unlöslich, ebenso im NaCl physiol.; auch in Serum gelingt die Peptisation nur teilweise, so dass man annehmen muss, dass in vivo die lyophilen Eigenschaften der löslichen Komponente notwendig sind, um die unlösliche zu peptisieren; in 0,1-n. CH₃COOH löst sie sich allmählich zu einem grobdispersen Sol. Von demselben werden zur Bestimmung des I.E.P. je 0,1 cm³ mit 8 cm³ Wasser verdünnt und 3 cm³ Veronal-Acetat-Puffer-Gemisch vom p_H Bereich 5,5–7,5 und $\mu = 0,1$ zugefügt. Die im Stufenphotometer ermittelten Trübungen ergeben beim Röhrchen mit p_H 6,6 ein Maximum. Die elektrophoretische Wanderung bei p_H 4 geschieht somit kathodisch; Fig. 2 zeigt das Elektrophorese-Diagramm und Tabelle 6 die Zusammensetzung.

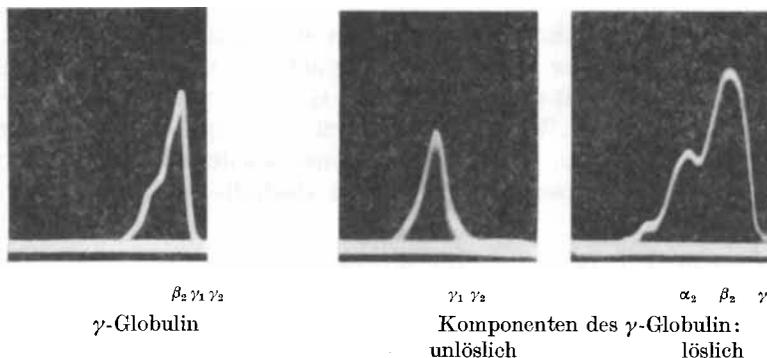


Fig. 2.
Elektrophorese-Diagramme

Tabelle 6.

Protein- Fraktionen	γ -Globulin (Mensch)			Komponenten des γ -Globulins (Mensch)					
				unlöslich			löslich		
	rel. %	abs. %	u	rel. %	abs. %	u	rel. %	abs. %	u
α_2	—	—	—	—	—	—	5,1	0,43	8,45
β_2	2,1	0,13	4,23	—	—	—	28,1	2,39	5,81
γ_1	29,0	1,77	3,05	6,5	0,20	14,82	γ 66,8	5,68	2,50
γ_2	68,9	4,20	1,84	93,5	2,95	11,98			

Die lösliche Komponente des γ -Globulins wird für die Elektrophorese mit soviel *Michaelis*-Puffer von p_H 7,9 verdünnt, dass ein Gehalt von 2,8% Protein resultiert. Der ebenfalls nephelometrisch bestimmte I.E.P. wird bei p_H 6,4 gefunden. Das Verhältnis der unlöslichen zur löslichen Komponente zeigt beträchtliche Schwankungen; es wird im Mittel von 4 Bestimmungen wie 1:3,8 gefunden; der nach *Seibert* und *Atno*¹⁾ kolorimetrisch bestimmte Kohlehydratgehalt beträgt für die unlösliche Komponente 5,7% und für die lösliche 2,4%. Der kombinierte Gesamtwert für γ -Globulin nähert sich den Angaben von *G. Blix*, *A. Tiselius* und *H. Svensson*²⁾, welche im γ -Globulin aus menschlichem Serum 3,6% und 3,0% gefunden haben. Es sei erinnert, dass *L. Pillemer* et al.³⁾ in einer Komponente des Euglobulins 10,3% Kohlehydrat fanden, ferner *W. H. Seegers*⁴⁾ im Prothrombin und Thrombin 3,8—6,2%.

Nach der Auswertung des Diagrammes des γ -Globulins (s. Tab. 6) ergibt sich dessen Reinheit zu 97,9%. Möglicherweise hat sich mit der grössten Beweglichkeit ein Extra-Gradient (ϵ -Boundary) abgebildet, so dass die Reinheit nahezu an 100% herankommen dürfte.

Die Form des Diagrammes der unlöslichen Komponente des γ -Globulins erweist deutlich ihre Homogenität bei p_H 4, wogegen der lösliche Anteil sich bei p_H 7,9 vielfältiger aufteilt. Die Versuchszeit war 7500 Sek. und die übrigen technischen Daten gleich wie vorn.

Zusammenfassung.

Es werden die Ergebnisse der ausgewerteten Elektrophorese-Diagramme angegeben vom Blutserum von Mensch, Pferd, Rind und Maultier, ebenso diejenigen der einmaligen Fällung mit Ammoniumsulfat. Die Elektrophorese als Kontrollanalyse dient dazu, den Einfluss der Fällungstemperatur darzutun.

Zur Anreicherung an γ -Globulin wird das gefällte Proteingemisch mit Tricalciumphosphat behandelt, ferner mit Äthanol in der Kälte gefällt und die Albuminkomponente mit Pepsin abgebaut.

Durch dreifach wiederholte Fällung wird reines γ -Globulin erhalten. Dasselbe wird durch Dialyse in zwei Komponenten zerlegt, welche sich durch verschiedene Löslichkeit auszeichnen. Ihre Diagramme werden gezeigt.

Medizinische Universitätsklinik, Zürich.

¹⁾ *Seibert* und *Atno*, J. Biol. Chem. **163**, 511 (1946).

²⁾ *Blix*, *Tiselius* und *Svensson*, J. Biol. Chem. **137**, 485 (1941).

³⁾ *Pillemer*, *Ecker*, *Oncley* und *Cohn*, J. Exp. Med. **74**, 297 (1941).

⁴⁾ *Seegers*, J. Biol. Chem. **136**, 103 (1940).