

## 107. Vereinfachtes Verfahren zur Gewinnung von humanem Albumin und $\gamma$ -Globulin aus Blutplasma mittels Alkoholfällung

von Hs. Nitschmann, P. Kistler und W. Lergier.

(12. III. 54.)

### Einleitung.

Seit dem 2. Weltkrieg werden in vielen Ländern aus menschlichem Blutplasma klinisch verwendbare Fraktionen, insbesondere Albumin und  $\gamma$ -Globulin hergestellt. Dabei wird fast immer nach den von der Schule *E. J. Cohn's* (Boston, Mass.) ausgearbeiteten Alkoholfällungsmethoden Nr. 6<sup>1)</sup> und Nr. 9<sup>2)</sup> gearbeitet, welche die beiden genannten Fraktionen in sehr grosser Reinheit zu gewinnen gestatten (elektrophoretisch bis zu 99% einheitlich). Der Arbeitsaufwand, den die *Cohn'schen* Methoden erfordern, ist aber recht erheblich, und die hohe Reinheit der Präparate muss mit relativ schlechten Ausbeuten bezahlt werden. Nach den Erfahrungen im Blutspendedienst des Schweizerischen Roten Kreuzes beträgt die Ausbeute an Albumin ca. 60%, die an  $\gamma$ -Globulin<sup>3)</sup> ca. 55%. Bei einem so knappen und kostbaren Material wie dem menschlichen Plasma sind so mässige Ausbeuten auf die Länge nicht tragbar; dies umso mehr, als es bei Fraktionen, die klinisch verwendet werden sollen, überflüssig scheint, die anderen Plasmaproteine so vollständig zu eliminieren, wie dies bei der *Cohn'schen* Methode geschieht.

Die *Cohn'sche* Gruppe hat seit dem Kriege selber intensiv an der Ausarbeitung neuer Methoden für die Plasmafraktionierung gearbeitet. 1950 wurde Methode 10 veröffentlicht<sup>4)</sup>, die unseres Wissens aber nie für die Herstellung klinischer Präparate in Anwendung kam. Die Bostoner Schule ging vielmehr bald dazu über, auf den Alkohol als Fällungsmittel, mindestens bei den eigentlichen Trennungen, ganz zu verzichten und statt dessen die spezifisch fällende Wirkung von Schwermetallionen wie Zn<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup> und Pb<sup>++</sup> heranzuziehen. Angaben über die Prinzipien dieser Methode sind verschiedentlich besonders in Vorträgen gemacht<sup>5)</sup>, genaue Vorschriften aber noch nicht veröffentlicht worden. Die neue Zink-Methode, wie sie kurz genannt wird, ist für ein citratfreies Plasma entwickelt worden, wie es erhalten werden kann, wenn die Blutentnahme direkt durch einen Ionenaustauscher erfolgt, welcher das die Gerinnung bedingende Calcium durch Natrium ersetzt.

Da im Blutspendedienst des Schweizerischen Roten Kreuzes nicht daran zu denken war, bei den Blutentnahmen die einfache und bewährte Citratmethode für eine Methode aufzugeben, über deren praktische Eignung zur Zeit nur ungenügende Erfahrungen vorlagen, haben wir nach vereinfachten Fraktioniermethoden gesucht, die eine Verarbeitung des üblichen Citratplasmas gestatten. Wir beschränkten dabei nicht grundsätzlich neue Wege, sondern wir gingen von der *Cohn'schen* Methode 10 aus und blieben somit beim Alkohol als Fällungsmittel. Wir wissen zwar, dass der Alkohol die Lipoproteine bei Methode 6 und 9

1) *E. J. Cohn et al.*, Am. Soc. **68**, 459 (1946).

2) *J. L. Oncley et al.*, Am. Soc. **71**, 541 (1949).

3) Fraktionen II-3 und II-1,2 zusammengenommen.

4) *E. J. Cohn et al.*, Am. Soc. **72**, 465 (1950).

5) *E. J. Cohn et al.*, 2me Congrès international de biochimie, Paris 1952. *E. J. Cohn, J. L. Tullis, D. M. Surgenor & M. D. D'hont*, Science **114**, 479 (1951). „Blood Cells and Plasma Proteins“, Memoirs of the University Laboratory of Physical Chemistry related to Medicine and Public Health, Harvard University. Nr. 2, edited by *J. L. Tullis*, p. 29—57 (1953).

zum Teil denaturiert. Das Albumin dagegen wird in der Kälte nicht verändert. Beim  $\gamma$ -Globulin mögen gewisse physikalisch-chemische Eigenschaften, wie Teilchengewicht verändert werden, eindeutige Denaturierungserscheinungen werden aber nicht beobachtet. Auf alle Fälle bleiben seine Antikörpereigenschaften unverändert. Bei der Gewinnung von Albumin und  $\gamma$ -Globulin-Präparaten, die klinisch verwendet werden sollen, ist deshalb gegen die Verwendung von Alkohol nicht viel einzuwenden.

Eine weitere Variante zur Gewinnung von  $\gamma$ -Globulin, über die wir berichten möchten, stützt sich auf eine schon 1946 erschienene Arbeit von *Deutsch* und Mitarbeitern<sup>1)</sup>.

### I. Modifizierung der Methode 10 von *Cohn* zur Albumingewinnung.

Nach Methode 10 wird zuerst der Grossteil der Globuline samt Fibrinogen bei pH 5,8–5,9 mit 19% Alkohol ausgefällt (Niederschlag A). In Lösung bleiben das Albumin und ein Teil der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Globuline. Das Filtrat (a) wird mit Zinkacetat versetzt. Aus dem entstehenden Niederschlag soll das Albumin rein extrahiert werden können.

Will man von der Verwendung von Zink absehen, so ist es nahelegend, das Albumin aus Filtrat (a) unter den Bedingungen der Methode 6 (pH 4,8, 40% Alkohol, – 6°) auszufällen. Dies geht in der Tat sehr gut. Weiter haben wir gefunden, dass man bei allen Fällungen, entgegen den Originalvorschriften, 95-proz. Alkohol verwenden kann. Auf diese Weise bleiben die Volumina kleiner und es kann ziemlich viel Alkohol eingespart werden. Weder beeinflusst die dabei resultierende grössere Ionenstärke<sup>2)</sup> die Fällung von Niederschlag A, noch konnten – bei geeigneter Arbeitsweise – Denaturierungserscheinungen beobachtet werden.

Nach Methode 6 wird das erstmals gefällte Rohalbumin wieder aufgelöst, bei pH 4,5–4,7 und 10% Alkoholgehalt klar filtriert und dann erneut gefällt. Diese Operation bezweckt, den Salzgehalt des Albumins herabzusetzen und die Globulinreste so weit zu eliminieren, dass eine genügende Hitzestabilität erreicht wird. Wir fanden, dass diese Umfällung, die einen erheblichen Aufwand an Arbeitszeit und Alkohol und eine Einbusse an Ausbeute bedeutet, bei unserem Rohalbumin sehr gut umgangen werden kann. Löst man nämlich die mit der *Sharples*-Zentrifuge erhaltene Paste nur gerade in soviel Wasser, dass der in ihr noch enthaltene 40-proz. Alkohol auf 10% verdünnt wird, so bleibt der grössere Teil der noch vorhandenen Globuline ungelöst. Die Lösung kann nach dem Klären der Gefriertrocknung zugeführt werden.

<sup>1)</sup> *H. F. Deutsch, L. J. Gostings, R. G. Alberty & J. W. Williams, J. Biol. Chem.* **164**, 109 (1946).

<sup>2)</sup> Bei unsern eigenen Rezepten verzichten wir darauf, Ionenstärken zahlenmässig anzugeben, denn eine direkte Bestimmung ist unmöglich und aus der Zusammensetzung berechnete Werte sind in den protein- und alkoholhaltigen Systemen wegen der unübersichtbaren Dissoziationsverhältnisse fraglich.

Unsere genaue Vorschrift (modifizierte Methode 10) für die Gewinnung des Albumins lautet:

10 l Plasma<sup>1)</sup> von 0°, dessen Glucosegehalt 5% nicht übersteigen soll, werden mit 2,5 l 95-proz. Äthanol, dem 75 cm<sup>3</sup> Acetat-Puffer<sup>2)</sup> vom pH 4 beigemischt wurden, versetzt. Die Zugabe des vorgekühlten Alkohols erfolgt sehr gleichmässig im Verlaufe von ca. 2 Std. durch eine in das Plasma eingetauchte Kapillare. Gute Rührung und Kühlung unter scharfer Temperaturkontrolle sind unerlässlich. Die Temperatur soll stets wenig über dem Gefrierpunkt liegen. Endbedingungen: pH 5,8–5,9<sup>3)</sup>, 19%<sup>4)</sup> Alkohol, –5° bis –7°. Nach beendeter Alkoholzugabe wird die Mischung noch 12–16 Std. langsam gerührt und dann in der *Sharples*-Zentrifuge in Niederschlag A und Zentrifugat a getrennt (alles bei –5° bis –7°).

Zum Zentrifugat wird unter analogen Bedingungen wie zuvor genügend 95-proz. Alkohol zugegeben, um die Konzentration von 19 auf 40% zu erhöhen<sup>5)</sup>. Die Zugabe soll ca. 3 Std. beanspruchen. Am Schluss wird das pH mit 1-m. Essigsäure auf  $4,8 \pm 0,2$  herabgesetzt. Man lässt über Nacht bei –7° unter langsamem Rühren stehen. Der Niederschlag wird dann in der *Sharples*-Zentrifuge abgetrennt. Das Zentrifugat soll durch Trichlor-essigsäure höchstens noch ganz schwach getrübt werden.

Das feuchte Roh-Albumin wird gewogen. 75% seines Gesamtgewichtes sind erfahrungsgemäss 40-proz. Alkohol<sup>6)</sup>. Man löst nun die Paste in soviel Wasser<sup>7)</sup>, dass der in ihr enthaltene 40-proz. Alkohol auf 10% verdünnt wird<sup>8)</sup>. Die Lösung wird bei unverändertem pH einige Std. bei 0 bis –2° gerührt, dann zentrifugiert und schliesslich durch eine *Filtrox*-Platte Nr. 3<sup>9)</sup> unter Druck filtriert. Die jetzt vollständig klare Lösung wird auf das doppelte Volumen mit Wasser verdünnt und der Gefriertrocknung zugeführt.

Die Fällung des Niederschlages A kann auch in 2 Schritten erfolgen, indem man die Zugabe des 95-proz. Alkohols unterbricht, wenn seine Konzentration im Plasma 8% erreicht hat. Das pH soll ca. 7,2 betragen. Die entstandene Fällung wird abzentrifugiert und das Zentrifugat auf die Bedingungen für die Fällung von Niederschlag A gebracht. Der erste Niederschlag entspricht der Fraktion I in *Cohn's* Methode 6, besteht also im wesentlichen aus Fibrinogen. Es kann den bekannten Verwendungen zugeführt werden, sofern Frischplasma verarbeitet wurde. Trockenplasma ergibt ein stark andenaturiertes Fibrino-

1) Citratplasma, frisch oder wieder aufgelöstes Trockenplasma. Wir haben meist mit Trockenplasma des Blutspendedienstes des Schweiz. Roten Kreuzes gearbeitet. Es enthält nach vorschriftsgemässem Wiederauflösen 4–5% Protein, 0,64% tertiäres Natriumcitrat, 0,188% Zitronensäure und 5% Glucose.

2) Zusammensetzung: 200 cm<sup>3</sup> 4-m. Na-Acetatlösung, 400 cm<sup>3</sup> 10-m. Essigsäure, 400 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.

3) Für die pH-Messungen mit der Glaselektrode werden die Lösungen soweit mit 0,9-proz. NaCl-Lösung verdünnt, dass die Alkoholkonzentration nicht mehr als 10% beträgt.

4) Volumen-Prozente.

5) Die benötigte Alkoholmenge kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$x = V \cdot \frac{G - A}{R - G},$$

worin x = benötigtes Reagensvolumen; V = Volumen der Ausgangslösung; G = %-Gehalt der gewünschten Lösung; A = %-Gehalt der Ausgangslösung; R = %-Gehalt der Reagenslösung.

6) Wenn unter stets gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert wird, genügt es, wenn der Trockengehalt der Paste ein für allemal bestimmt wird.

7) Alles bei der Fraktionierung verwendete Wasser muss destilliert und streng pyrogenfrei sein.

8)  $x = V \cdot (A - G)/G$ , vgl. Fussnote 5.

9) *Filtrox-Werke*, St. Gallen (Schweiz).

gen, wie man an seiner mangelhaften Löslichkeit feststellen kann. Die Vorfällung von Fraktion I empfiehlt sich besonders dann, wenn aus Niederschlag A  $\gamma$ -Globulin gewonnen werden soll. Nach den Erfahrungen der *Cohn'schen* Gruppe<sup>1)</sup> werden allfällig vorhandene Hepatitis-Virus-Teilchen weitgehend mit Fraktion I niedergeschlagen. Dies wird als Grund dafür angesehen, dass das aus dem Überstehenden nach Methode 9 gewonnene  $\gamma$ -Globulin, so viel man weiss, stets frei von diesem Virus ist<sup>2)</sup>.

Die Vorfällung von Fraktion I stellt also einen Sicherheitsfaktor dar, auf den man nicht ohne besondere Gründe verzichten wird.

Die Konfektionierung des Albumins für die klinische Verwendung geschieht im Blutspendedienst des Schweizerischen Roten Kreuzes wie folgt:

Je 25 g trockenes Albumin werden mit einer Lösung, die 0,04-m. an Na-Mandelat<sup>3)</sup> und 0,08-m. an NaCl<sup>3)</sup> ist, zu 100 cm<sup>3</sup> gelöst. Die Lösung wird steril filtriert (Steril S-Filter *Filtrox*), abgefüllt und verschlossen. Schliesslich werden die Fläschchen 10 Std. bei 60° pasteurisiert<sup>4)</sup>.

In Tab. 1 sind eine Reihe von Daten zusammengestellt, die einen Vergleich zwischen der Albumindarstellung nach der von uns modifizierten Methode 10 und der nach der *Cohn'schen* Methode 6 gestatten.

**Tabelle 1.**

Vergleich zwischen *Cohn's* Methode 6 und der modifizierten Methode 10 zur Darstellung von Albumin.

|   | Methode 6 | Methode 10<br>modifiziert |
|---|-----------|---------------------------|
| Ausbeute an Albumin in % bezogen auf das gesamte Plasmaprotein . . . . .              | 32—36     | 46—54                     |
| Reinheit, elektrophoretisch ( <i>Tiselius</i> ) in % . . . . .                        | 97—99     | 93—99                     |
| Ausbeute an Reinalbumin in % bezogen auf Gesamtalbumin des Plasmas . . . . .          | 55—65     | 80—95                     |
| Glührückstand in % . . . . .  | ca. 1,5   | ca. 1,6                   |
| Cholesteringehalt <sup>5)</sup> in % . . . . .  | 0,11      | 0,16                      |
| Hitzestabilitätsteste entsprechend den „Minimum Requirements“ <sup>6)</sup> . . . . . | sehr gut  | sehr gut                  |
| Alkoholverbrauch in l für 10 l Plasma . . . . .                                       | ca. 10,4  | ca. 7,3                   |
| Max. Lösungsvolumen in l . . . . .  | ca. 22    | ca. 17,3                  |
| Zeitaufwand in ungefähren Relativzahlen . . . . .                                     | 3         | 1                         |

Die Zahlen sind Durchschnittswerte zahlreicher 10-l-Ansätze. Sie zeigen, dass die neue Methode gestattet, mit bedeutend geringerem

<sup>1)</sup> *C. A. Janeway*, persönliche Mitteilung und *J. Am. Med. Ass.* **138**, 859 (1948).

<sup>2)</sup> *R. Murray & F. Ratner*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **83**, 554 (1953).

<sup>3)</sup> Statt des früher in USA. verwendeten Acetyltryptophans. Diese Salze bewirken wie jenes eine Stabilisierung des Albumins bei der nachfolgenden Erhitzung.

<sup>4)</sup> Diese Wärmebehandlung soll allfällig noch vorhandene Hepatitis-Virusteilchen abtöten. Vgl. *S. S. Gellis, Neeffe, Stokes, Strong, Janeway & Scatchard*, *J. Clin. Invest.* **27**, 239 (1948).

<sup>5)</sup> Nach *A. Zlatkis, B. Zak & A. J. Boyle*, *J. Lab. Clin. Med.* **41**, 486 (1953).

<sup>6)</sup> 8th Revision, July 30, 1953, National Institutes of Health, Bethesda 14, Maryland, U.S.A.

Aufwand an Alkohol und insbesondere an Arbeitszeit eine viel bessere Ausbeute an Albumin zu erzielen als mit Methode 6. Die elektrophoretische Reinheit der neuen Präparate steht der der alten kaum nach. Das wenige in ihnen enthaltene Globulin besteht ungefähr zu 15 % aus  $\alpha$ -, 50 % aus  $\beta$ - und 35 % aus  $\gamma$ -Globulin. Die fertig konfektionierte Lösung hat sich im Tierversuch<sup>1)</sup> als nicht toxisch erwiesen. Pyrogenfreiheit bleibt dank des verkürzten Arbeitsganges besonders leicht gewahrt. Bei der klinischen Anwendung der 25-proz. Lösung haben sich keine Unterschiede gegenüber den nach Methode 6 gewonnenen Präparaten gezeigt.

## II. Modifizierung der Methode 10 von Cohn zur Gewinnung von $\gamma$ -Globulin.

Nach Methode 10 wird das  $\gamma$ -Globulin aus dem Niederschlag A bei pH 5,5 und  $-5^{\circ}$  durch 15-proz. Alkohol mit 0,6-m. Glycin extrahiert. Das Glycin dient dazu, die in diesem Niederschlag vorliegende Verbindung zwischen  $\gamma$ -Globulin und  $\beta$ -Lipoprotein aufzubrechen.

Wir fanden, dass die Extraktion sehr gut gelingt, die Abtrennung des Glycins vom  $\gamma$ -Globulin aber schwierig ist. Dialyse ist für eine Fabrikation im Grossen ungeeignet. Beim Ausfällen des  $\gamma$ -Globulins aus dem Extrakt mit Alkohol fällt sehr viel Glycin mit, da isoelektrische Punkte und Löslichkeiten der beiden Stoffe sehr ähnlich sind. Wir haben einen sehr guten und billigen Ersatz für das Glycin im Harnstoff gefunden, bei dem die genannten Schwierigkeiten nicht auftreten, da seine Löslichkeit auch im Alkohol sehr beträchtlich ist. Harnstoff wirkt nur in relativ hohen Konzentrationen denaturierend auf Protein, in mässigen Konzentrationen ist er ganz ungefährlich, wirkt aber noch löslichkeitserhöhend.

Die nachfolgende Arbeitsvorschrift ist das Ergebnis zahlreicher Versuche zum Auffinden optimaler Bedingungen.

Extraktionsmittel: 15-proz. Alkohol mit 0,5-m. Harnstoff.

Der aus 10 l Plasma nach unserer modifizierten Methode 10 gewonnene Niederschlag A wird bei  $-5^{\circ}$  möglichst fein in 5 l des obigen Extraktionsmittels suspendiert, das pH mit pH-4-Puffer auf 5,1–5,2 eingestellt und die Suspension während 60 Min. gerührt<sup>2)</sup>. Dann wird scharf zentrifugiert. Der Niederschlag wird noch dreimal in gleicher Weise extrahiert. Der letzte Extrakt soll praktisch kein Protein mehr enthalten<sup>3)</sup>. Die fast klaren Extrakte (evtl. ohne den letzten) werden vereinigt. Das  $\gamma$ -Globulin lässt sich nun unter den gleichen Bedingungen wie Fraktion II–1,2 bei Methode 9 ausfällen.

In den vereinigten Extrakten wird das pH mit 0,1-n. NaOH auf 6,8–7,2 gebracht. Alsdann gibt man unter den üblichen Vorsichtsmassregeln bei  $-5^{\circ}$  genügend 95-proz. Alkohol zu, um die Konzentration auf 25% zu erhöhen. Man lässt über Nacht stehen und zentrifugiert. Sollte das Zentrifugat wider Erwarten wesentliche Mengen Protein enthalten, so kann die Alkoholkonzentration noch um einige Prozente erhöht werden.

<sup>1)</sup> Nach den Vorschriften der „Minimum Requirements“.

<sup>2)</sup> Längere Extraktion gibt unreinere Präparate ohne wesentliche Vergrösserung der Ausbeute.

<sup>3)</sup> Prüfung mit Trichloressigsäure.

Das ausgefällte  $\gamma$ -Globulin muss nun noch vom restlichen Harnstoff befreit werden; denn er würde beim Trocknungsprozess so weit konzentriert, dass er evtl. denaturierend wirken könnte. Der Niederschlag wird deshalb drei- bis viermal mit 1–2 l sehr verdünntem Acetatpuffer (Ionenstärke ca. 0,005) vom pH 7,0  $\pm$  0,2, enthaltend 25% Alkohol, durch Suspendieren und erneutes Zentrifugieren ausgewaschen. Das gewaschene  $\gamma$ -Globulin wird in etwa 2 l H<sub>2</sub>O aufgelöst und die Lösung der Gefriertrocknung unterworfen.

Über Ausbeute und Eigenschaften des so gewonnenen  $\gamma$ -Globulins gibt Tab. 2 Auskunft.

**Tabelle 2.**  
Vergleich zwischen vier Methoden zur Gewinnung von  $\gamma$ -Globulin.

|   | Methode                |                        |                        |                              |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|
|   | 6 und 9 <sup>1)</sup>  | 6 und <i>Deutsch</i>   | 10-modif. (Harnstoff)  | 10 modif. ( <i>Deutsch</i> ) |
| Ausbeute an $\gamma$ -Globulin in % bezogen auf das gesamte Plasmaprotein . . . . .             | 5–6                    | 6–7                    | 6–7                    | 7–8                          |
| Reinheit in % (elektrophoretisch) <sup>2)</sup> . . .   | 90–99                  | 90–99                  | 90–98                  | 90–99                        |
| Ausbeute an Reinsubstanz in % bezogen auf das gesamte $\gamma$ -Globulin des Plasmas            | 50–60                  | 60–70                  | 60–70                  | 70–80                        |
| Glührückstand in % . . . . .  | 1,5                    | 0,5                    | 0,8                    | 0,6                          |
| Cholesteringehalt in % <sup>4)</sup> . . . . .  | 0,75                   | 0,75                   | 1,12                   | 0,75                         |
| Esteraseaktivität <sup>4)</sup> . . . . .   | 0                      | 0                      | 1/24 <sup>3)</sup>     | 0                            |
| Agglutinititer <sup>4)</sup>  |                        |                        |                        |                              |
| Anti A <sub>1</sub> . . . . .   | { 1:16 +<br>1:32 $\pm$ | { 1:16 +<br>1:32 $\pm$ | { 1: 8 +<br>1:16 $\pm$ | { 1:16 +<br>1:32 $\pm$       |
| Anti B . . . . .  | { 1: 4 +<br>1: 8 $\pm$ | { 1: 2 +<br>1: 4 $\pm$ | { 1: 4 +<br>1: 8 $\pm$ | { 1: 4 +<br>1: 8 $\pm$       |
| Alkoholverbrauch in l für Aufarbeitung von Niederschlag II+III bzw. A aus 10 l Plasma . . . . . | 9,5                    | 5,0                    | 9,5                    | 5,5                          |
| Max. Lösungsvolumen in l . . . . .  | 19–21                  | 13–15                  | 20–23                  | 16–19                        |

*Deutsch* und Mitarbeiter<sup>5)</sup> haben schon 1946 mitgeteilt, dass das  $\gamma$ -Globulin aus der *Cohn*'schen Fraktion II + III in sehr guter Ausbeute und Reinheit mit 17-proz. Alkohol bei pH 5,1 und sehr kleiner Ionenstärke (ca. 0,01) extrahiert werden kann. Diese Methode war im Blutspendedienst des Schweizerischen Roten Kreuzes schon einige Zeit mit gutem Erfolg auf die nach Methode 6 erhaltene Fraktion II + III angewendet worden. Es hat sich nun gezeigt, dass die Me-

<sup>1)</sup> Die Angaben beziehen sich auf das  $\gamma$ -Globulin, das durch Vereinigung der Fraktionen II-1,2 und II-3 erhalten wird.

<sup>2)</sup> Forderung der „Minimum Requirements“: 90%.

<sup>3)</sup> 1/24 der Aktivität einer 1-proz. Lösung einer im Blutspendedienst des SRK hergestellten Fraktion IV-4.

<sup>4)</sup> An Präparaten bestimmt, die aus ein und demselben Mischplasma gewonnen wurden.

<sup>5)</sup> *H. F. Deutsch, L. J. Gosting, R. A. Alberty & J. W. Williams, J. Biol. Chem.* **164**, 109 (1946).

thode von *Deutsch*, wie wir sie der Kürze halber nennen, auch für die Gewinnung von  $\gamma$ -Globulin aus Niederschlag A der modifizierten Methode 10 sehr geeignet ist. Niederschlag A unterscheidet sich von der Fraktion II + III vor allem durch einen wesentlich höheren Gehalt an  $\alpha$ -Globulinen<sup>1</sup>). Diese werden aber nur zu einem kleinen Teile mitextrahiert, weil das Extraktions-pH sehr nahe bei ihrem isoelektrischen Punkte liegt. Versuche zur Reduktion der Volumina und damit zur Einsparung von Alkohol ergaben alle verminderte Ausbeuten, so dass wir uns heute ziemlich genau an die von *Deutsch* und Mitarbeitern empfohlenen Bedingungen halten.

Jedes kg Niederschlag A (feuchte Paste) wird in 10 l Wasser von 0° suspendiert. Man gibt langsam eine Mischung von 680 cm<sup>3</sup> 0,05-m. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 4170 cm<sup>3</sup> 0,05-m. Essigsäure zu, die das pH des Systems auf  $4,8 \pm 0,05$  bringt. Nach 2–3 Std. Rühren bei 0° wird das pH durch Zugabe von 2640 cm<sup>3</sup> 0,05-m. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2260 cm<sup>3</sup> 0,05-m. Essigsäure auf  $5,1 \pm 0,04$  erhöht. Die Mischung wird dann mit 9,7 l Wasser von 0° verdünnt und die Alkoholkonzentration durch vorsichtigen Zusatz von 6,3 l 95-proz. Alkohol auf 17% gebracht. Dabei wird die Temperatur immer so tief wie möglich gehalten. Sie soll zuletzt  $-6,5^{\circ}$  betragen. Nach 1 Std. wird zentrifugiert und das Zentrifugat durch Filtration vollständig geklärt. Die Ausfällung des  $\gamma$ -Globulins aus dem Filtrate erfolgt in gleicher Weise wie beim Harnstoffextrakt der modifizierten Methode 10, d. h. durch 25% Alkohol bei mit 0,1-n. NaOH auf 6,8–7,2 erhöhtem pH.

In Tab. 2 ist die modifizierte Methode 10 in ihren zwei Varianten (Extraktion des  $\gamma$ -Globulins mit Harnstoff und nach *Deutsch*) zwei älteren Methoden gegenübergestellt, nämlich *Cohn's* bekannter Methode 6 und 9 und der Methode 6 kombiniert mit der Extraktion nach *Deutsch*.

Methode 10 modifiziert (Harnstoff) gibt ungefähr die selben Ausbeuten, wie die mit der Extraktion nach *Deutsch* kombinierte Methode 6. Die modifizierte Methode 10 kombiniert mit der Extraktion nach *Deutsch* gibt eine noch höhere Ausbeute, nämlich bis 80%, und zwar berechnet für reines  $\gamma$ -Globulin. Diese Ausbeutesteigerung wird ohne Einbusse an Reinheit erreicht, die sich bei allen vier Präparationsmethoden ungefähr in den gleichen Grenzen hält. Begleiter sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulin, sowie Albumin. Kleine Unterschiede in der Zusammensetzung dieser Begleitproteine, wie sie aus den Esterase- und den Agglutinintiter-Bestimmungen hervorgehen, sind mindestens für die klinische Verwendung der Präparate als Immunglobulin ohne Bedeutung. Sicherheitstest, Pyrogentest, Trübungs- und Hitzestabilitätstest, ausgeführt mit 16-proz. Lösungen vom pH  $6,8 \pm 0,2$  (enthaltend 2,25% Glycin) nach den Angaben der „Minimum Requirements“ für Immun-Serum-Globulin<sup>2</sup>) haben bei allen Präparaten gute

---

<sup>1</sup>) Die nach der von uns modifizierte Methode 10 nach Vorfällung von Fraktion I gewonnenen Niederschläge A haben im Durchschnitt folgende Zusammensetzung: 23,5%  $\gamma$ -, 27,0%  $\beta_2$ -, 34,0%  $\beta_1$ -, 4,5%  $\alpha_2$ -, 10,5%  $\alpha_1$ -Globulin + Albumin.

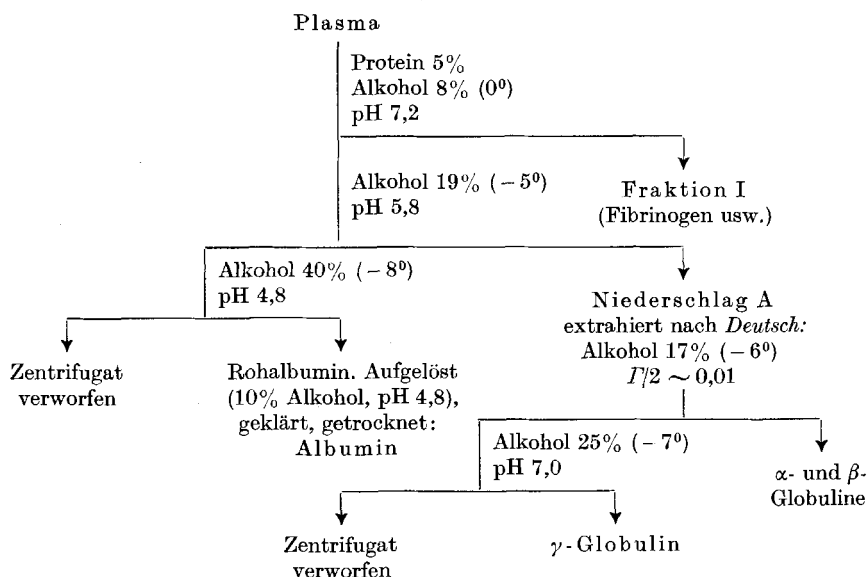
<sup>2</sup>) 3rd Revision, April 1953. National Institutes of Health, Bethesda 14, Maryland, U.S.A.

Resultate gezeigt<sup>1)</sup>. Der Zeitaufwand ist bei der zweiten, dritten und vierten Methode der Tab. 2 sehr viel kleiner als bei *Cohn's* Methode 6 und 9.

Am wirtschaftlichsten ist zweifellos die modifizierte Methode 10 mit Extraktion nach *Deutsch*, da sie mit dem geringsten Verbrauch an Alkohol sehr rasch zu Ausbeuten führt, die wohl nur noch schwer wesentlich überboten werden können. Die Methode ist deshalb in Tab. 3 noch einmal übersichtlich dargestellt<sup>2)</sup>.

**Tabelle 3.**

Schema für die modifizierte Methode 10 (*Deutsch*).



SUMMARY.

A modification of *Cohn's* Method 10 for the fractionation of citrated human plasma is described. Albumin and  $\gamma$ -globulin can be obtained in almost the same purity as by Methods 6 and 9, but with a simpler procedure and higher yields.

Bern, Theodor-Kocher-Institut der Universität  
und Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes  
des Schweizerischen Roten Kreuzes.

<sup>1)</sup> Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass der Beweis noch nicht erbracht werden konnte, dass die wie hier beschrieben hergestellten  $\gamma$ -Globulin-Präparate auch dann frei von Serum-Hepatitis-Virus sind, wenn das Ausgangsplasma infiziert war.

<sup>2)</sup> Mitteilungen über anderswo gemachte Erfahrungen mit dieser Methode und den mit ihr erhaltenen Präparaten wären den Autoren sehr erwünscht.