

# **Darstellung des $\beta_1$ -metallbindenden Globulins aus vorfraktioniertem menschlichem Retroplacentarserum mit Rivanol**

Von G. BRÄSE

Mit 8 Abbildungen

## **Inhaltsübersicht**

Die Isolierung des  $\beta_1$ -metallbindenden Globulins mit Rivanol bei gleichzeitiger pH-Verschiebung sowie dessen chemische und chemisch-physikalische Daten werden beschrieben.

BOETTCHER, KISTLER und NITSCHMANN<sup>1)</sup> berichteten 1958 über die Darstellung des  $\beta_1$ -metallbindenden Globulins (Transferrin<sup>2)</sup>, Siderophilin<sup>3)</sup>) aus menschlichem Plasma mittels Rivanol (2-Äthoxy-6,9-Diaminoacridinlactat). In Anlehnung an HOŘEJŠÍ und SMETANA<sup>4)</sup> fällten sie durch Zusatz von 0,4proz. Rivanollösung (1 Teil Plasma + 3,5 Teile Rivanollösung)  $\beta_1$ -metallbindendes Globulin und  $\gamma$ -Globulin aus. Durch Tieftemperaturfraktionierung mit Äthanol bei  $-6^\circ\text{C}$  wurde daraus das  $\gamma$ -Globulin entfernt und durch anschließende nochmalige Fraktionierung mit Rivanol das  $\beta_1$ -metallbindende Globulin weitgehend gereinigt. Weitere Darstellungsmethoden finden sich unter <sup>5)</sup> und <sup>6)</sup>.

Bei unseren Versuchen zur Isolierung des  $\beta_1$ -metallbindenden Globulins aus Retroplacentarserum gingen wir nicht von Plasma oder Vollserum, sondern einer Nebenfraktion (NIIÜ) aus, die bei der hier entwickelten Methanol-Mitteltemperaturfraktionierung<sup>7)</sup> zur Gewinnung von Human- $\gamma$ -Globulin anfällt. Dabei fanden wir eine weitgehende Abhängigkeit der Rivanolfractionierung vom pH-Wert. Die Fraktion NIIÜ, die neben  $\beta$ -Globulinen noch Albumin und  $\gamma$ -Globulin enthält (Abb. 1), wurde zu diesem Zweck mit Pufferlösungen verschiedener pH-Werte versetzt und

<sup>1)</sup> E. W. BOETTCHER, P. KISTLER u. H. NITSCHMANN, *Nature* **181**, 490 (1958).

<sup>2)</sup> C. G. HOLMBERG u. C. B. LAURELL, *Acta Chem. Scand.* **1**, 944 (1947).

<sup>3)</sup> A. L. SCHADE, R. W. REINHART u. H. LEVY, *Arch. Biochem.* **20**, 170 (1949).

<sup>4)</sup> J. HOŘEJŠÍ, u. R. SMETANA, *Acta Med. Scand.* **155**, 65 (1956).

<sup>5)</sup> H. E. SCHULTZE, K. HEIDE u. H. MÜLLER, *Behringwerk-Mitteilungen* **32**, 25 (1957).

<sup>6)</sup> J. KOŘÍNEK, M. FREIOVÁ u. J. ČEJKA, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **25**, 2679 (1960).

<sup>7)</sup> G. ZIMMERMANN, unveröffentlicht.

dann in üblicher Weise mit Rivanol gefällt. Die Niederschläge wurden verworfen, die Filtrate mit Aktivkohle entfärbt und elektrophoretisch auf ihre Zusammensetzung untersucht. Während bei pH-Werten unter 7,0 nur Albumin gefällt wurde, fielen bei darüber liegenden pH-Werten bereits  $\beta$ -Globuline aus, und bei pH-Werten über 9,3 enthielt die Lösung nur noch  $\gamma$ -Globulin (Abb. 2–5).

Auf Grund dieser Vorversuche wurde zur präparativen Darstellung des  $\beta_1$ -metallbindenden Globulins die Fraktion NIIÜ durch Fällung mit

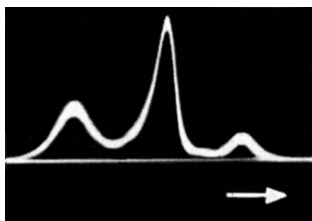


Abb. 1. Ausgangsfraction (NIIÜ), Aufnahme n. 60 Min., 200 V, 20 mA;  $\angle$  29,4°

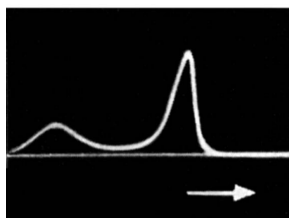


Abb. 2. Filtrat n. Rivanolfractionierung bei pH 7,0; Aufnahme n. 95 Min., 180 V, 20 mA;  $\angle$  28,5°

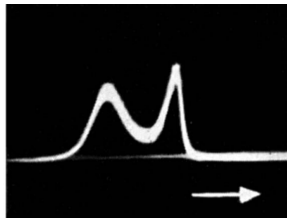


Abb. 3. Filtrat n. Rivanolfractionierung bei pH 8,8; Aufnahme n. 60 Min., 200 V, 20 mA,  $\angle$  28,1°

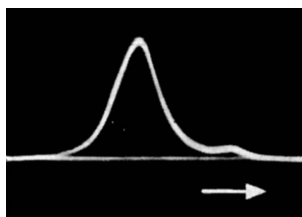


Abb. 4. Filtrat n. Rivanolfractionierung bei pH 9,2; Aufnahme n. 90 Min., 180V, 20mA;  $\angle$  29,0°

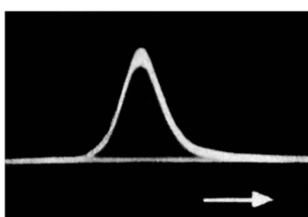


Abb. 5. Filtrat n. Rivanolfractionierung bei pH 9,4; Aufnahme n. 60 Min., 190V, 20mA;  $\angle$  29,1°

Abb. 1—5. Tiselius-Elektrophoresen in Michaelis-Puffer pH 8,6, Ionenstärke 0.1; Proteinkonzentration 1,5 %

Rivanol in BRITTON-ROBINSON-Puffer bei pH 7,2 von Albumin befreit, anschließend wurde der pH-Wert durch Zusatz von 0,2 n NaOH auf pH 9,0 eingestellt. Der ausgefallene Niederschlag wurde in Azetatpuffer pH 6,0 aufgenommen, die Lösung mit Aktivkohle von Rivanol befreit, dialysiert und lyophil getrocknet. Eventuell noch vorhandene geringe Mengen  $\gamma$ -Globulin können durch Adsorption der Lösung an Aluminiumhydroxyd-Gel entfernt werden.

Die Einheitlichkeit des isolierten  $\beta_1$ -metallbindenden Globulins konnte elektrophoretisch (Abb. 6) und mit Hilfe der Ultrazentrifuge (Abb. 7) bestätigt werden. Immunelektrophoretisch<sup>8)</sup> ließen sich bei Verwendung

$\beta_1$ -metallbindendes Globulin

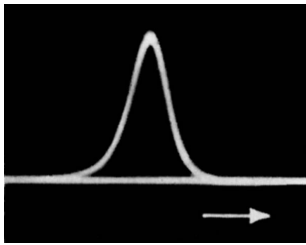


Abb. 6. Tiselius-Elektrophorese in Michaelis-Puffer pH 8,6; Ionenstärke 0,1; Proteinkonz. 2,0%, Aufnahme n. 200 Min., 200 V, 20 mA,  $\sphericalangle$  30,3°

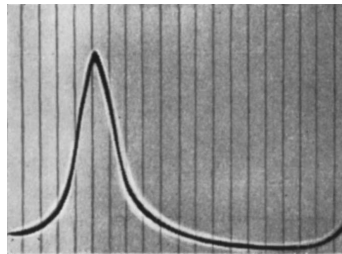


Abb. 7. Sedimentation in der Ultrazentrifuge. Proteinkonzentration 1,5%, 50000 U/Min.  $S_{20}^{1,5} = 5,9$

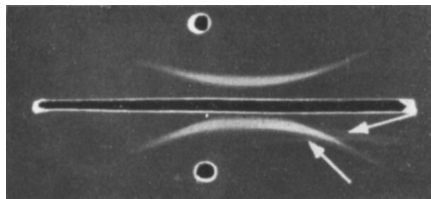


Abb. 8. Immunelektrophorese. Anti-Human- $\beta, \gamma$ -Globulin-Serum v. Kaninchen gegen  $\beta_1$ -metallb. Globulin

eines vom Kaninchen gewonnenen Anti-Human- $\beta, \gamma$ -Globulinserums und hoher Konzentration des Antigens (8proz.) noch  $\beta_2$ - und  $\gamma$ -Globulin in Spuren als Verunreinigungen nachweisen (Abb. 8). Die ermittelten chemischen und chemisch-physikalischen Daten stehen in guter Übereinstimmung zu anderen Literaturwerten.

<sup>8)</sup> G. ZIMMERMANN u. K. KRÜGER, Pharmazie 14, 223 (1959).

	eigene Werte	Literaturwerte nach		
		SCHULTZE		KOECHLIN
		5)	9)	10)
Stickstoff (KJELDAHL)	15,4%	15,3%	15,4%	14,7%
Hexosen <sup>11)</sup>	2,6%	2,0%	1,8%	1,8%
Hexosamin <sup>12)</sup>	1,2%	1,6%	1,3%	
Schwefel <sup>13)</sup>	0,56%			
Lipoide*)	0,1%	—	—	
Asche	1,0%		0,5%	
Sedimentationskonst. S <sub>20</sub>	5,9	6,1	5,0	
Diffusionskonst. D <sub>20</sub>	5,9	6,2		
Molekulargewicht	88000**)	89000		90000
N-endständige Aminosäure <sup>14)</sup>	Val (Spuren v. Asp)	Val		

\*) Extrahiert mit heißem Methanol, eingedampft und in Petroläther aufgenommen.

\*\*\*) Unter Verwendung eines spezifischen Volumens von 0,725<sup>5)</sup>.

<sup>9)</sup> H. E. SCHULTZE, Z. Elektrochem. **60**, 262 (1956).

<sup>10)</sup> B. A. KOECHLIN, J. Amer. chem. Soc. **74**, 2649 (1952).

<sup>11)</sup> C. v. HOLT, Klin. Wschr. **32**, 661 (1954).

<sup>12)</sup> C. J. M. BONDLE u. W. T. J. MORGAN, Biochem. J. **61**, 586 (1955).

<sup>13)</sup> P. O. BETHGE, Analyt. Chem. **28**, 119 (1956).

<sup>14)</sup> G. ZIMMERMANN u. G. BRÄSE, in Vorbereitung.

Herrn Dr. G. ZIMMERMANN möchte ich an dieser Stelle für sein förderndes Interesse an vorliegenden Untersuchungen meinen besten Dank aussprechen. Frä. DORIS SPÖTTER danke ich für ihre Mithilfe bei der experimentellen Durchführung der Arbeit.

*Dessau, Forschungsinstitut für Impfstoffe.*

Bei der Redaktion eingegangen am 5. Dezember 1960.