

Diffusions- und Sedimentationsmessungen zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen und hochpolymeren Kunststoffen

Von GERNOT BERGOLD

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie, Abteilung Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforschg. 1, 100—108 [1946]; eingegangen am 10. Januar 1946)

Es wird über Diffusions- und Sedimentationsmessungen mit einer abgeänderten Diffusionsapparatur und einer umgebauten Phewe-Ultrazentrifuge berichtet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Tabellen 1—5 zusammengestellt.

1. Die Diffusionsapparatur

Der Konstruktion der Diffusionsapparatur liegt im wesentlichen die Schieberzelle von O. Lamm¹ zugrunde, nur habe ich die eigentliche Diffusionszelle wesentlich verkleinert und zur einfacheren Handhabung auf einen Reiter für eine optische Bank gebaut (s. Abb. 1—4).

Die Diffusionskammer (Höhe 14 mm, Breite 4 mm, Tiefe 12 mm) ist vor Diffusionsbeginn durch einen 1 mm dicken Schieber in zwei gleiche Hälften geteilt. Sie besteht ebenso wie der Schieber nicht aus Metall, sondern aus dem säure- und alkalifesten, nicht quellenden Kunststoff Polyvinylchlorid, der sich auch den empfindlichsten Proteinen gegenüber völlig neutral verhält und sich außerdem sehr gut dichten lässt. Die Diffusionskammer ist von einem Wasserbad umgeben, das ständig von einem Höppler-Ultrathermostaten durchspült wird und so auf $20,00 \pm 0,01^\circ$ gehalten werden kann. Zur Ausschaltung der von der Pumpe herührenden Vibrationen wird in die Zu- und Ableitung zum Wasserbad je ein Stoßdämpfer, federnd auf horizontalen Polyamidfäden hängend, eingeschaltet. Als Stoßdämpfer hat sich sehr gut ein dicht verschlossener Erlenmeyerkolben (etwa 1 l) bewährt, in welchen 2 Glasrohre als Zu- und Ableitung bis fast auf den Boden hineinragen. Der Kolben füllt sich nur etwa 5 cm hoch und das darüber befindliche große Luftvolumen fängt alle Druckstöße der Pumpe ab, sodaß zusammen mit den sehr weichen Gummischläuchen alle Vibrationen beseitigt werden. Der Heizkörper des Höppler-Thermostaten von 1200 W muß durch einen von nur 500 W ersetzt werden. Als Skalen wurden Spektralskalen (transparente Striche auf dunklem Grund) von Möller (Wedel i. Holstein) mit $\frac{1}{5}$ mm Strichabstand und 20 μ Strichdicke verwendet. Als Abbildungsoptik hat sich ein zweilinsiges, achromatisches Fernrohrobjektiv von Spindler und Höyer, Göttingen, mit einer Brennweite von $F = 80$ cm und einer

¹ „Ultrazentrifugierung und Diffusion als Methoden zur Untersuchung des Molekulargewichtes in Lösung“ in „Methoden der Fermentforschung“ von Baman-Myrbäck, Bd. 1, 659—699 [1941]. Thieme-Verlag, Leipzig.

Apertur von 1 : 23 sehr gut bewährt. Die Skala ist auf einem Reiter montiert und auf der optischen Bank (mit Zentimetermaßstab in der Rille) verschiebbar angeordnet. Sie wird, 1 : 2 vergrößert, durch die Diffusionszelle hindurch mit der etwa 2,5 m langen Kamera aufgenommen. Auf der optischen Bank der Kamera wurde in der Rille ein Zentimetermaßstab derart angebracht, daß die Kante des einen Kamerarohrreiters jeweils die Scharfeinstellung (auf die Skala bei gefüllter Zelle) des betreffenden Skalenabstandes anzeigt, sodaß während des Versuches verschiedene Skalenabstände sehr gut reproduzierbar und rasch eingestellt werden können. Als Lichtquelle hat sich die Osram-Hg-Hochdrucklampe HBO 200 (10000 lm, 25000 stilb, 200 W) in Verbindung mit einem Kondensor außerordentlich bewährt. Wegen der günstigen Lichtverhältnisse betragen die Belichtungszeiten bei den verwendeten Aperturen von 1 : 100 bis 1 : 60 unter Verwendung eines Blaufilters (Bg 12 + GG 15) zur Verminderung der Beugungsverbreiterung der Skalenstriche nur $\frac{1}{25}$ — $\frac{1}{100}$ sec, trotz der wenig empfindlichen, aber daher sehr feinkörnigen „Agfa“-Platten „Spektral Blau Extra Hart“ oder „Phototechnische Platte A“.

2. Die umgebaute Ultrazentrifuge

Die von der „Phewe“ in Göttingen nach G. Schramm² hergestellte, luftgetriebene Ultrazentrifuge ist für die Schlierenmethode eingerichtet. Da diese Methode gewisse Nachteile hat, habe ich die Zentrifuge für die Lamm'sche „Skalenmethode“ umgebaut. Die Apparaturen sind so durchkonstruiert, daß die Sedimentations- und Diffusionsmessung alternierend mit der gleichen Aufnahmeeoptik ohne gegenseitige Störung durchgeführt werden kann, wobei die Gesamtbedienung der Anlage bequem durch eine Assistentin erfolgt. Die gleichzeitige Messung der Sedimentation und der Diffusion ist bei sehr empfindlichen Proteinen von großem Vorteil.

² Kolloid. Z. 97, 106—115 [1941].



Der Skalenträger wurde direkt unterhalb des Rotors verschiebbar angebracht, sodaß während des Versuches Skalenabstände von 4—20 cm gewählt werden können. Dabei wird, ohne jedes Projektionssystem, immer direkt auf die Skala eingestellt. Die näheren Einzelheiten des Skalenträgers ergeben sich aus der Abb. 5. Durch geeignete Aufstellung der Ultrazentrifuge zwischen der Diffusionsapparatur und der Kamera kann durch zeitweise Zwischenschaltung eines Spiegelprismas die gleiche Kamera für die Diffusions- und Sedimentationsaufnahmen verwendet werden (Abb. 4). Dabei ist wieder ein Zentimetermaßstab in der Rille der optischen Bank derart angebracht, daß die Kante des zweiten Kamerarohrreiters die Scharf-einstellung (auf die Skala bei gefüllter Zelle) des betreffenden Skalenabstandes (Vergrößerung der Skala 1: 2) anzeigt. Es wurde die gleiche Skala wie für die Diffusionsmessung verwendet, desgleichen als Lichtquelle die HBO 200, wodurch in Verbindung mit zwei Kondensorlinsen bei den verwendeten Aperturen von 1: 100 bis 1: 60 Belichtungszeiten von etwa 5—1 sec möglich sind. Bei Verwendung der nur blau-empfindlichen Platten „Agfa Spektral Blau Hart“ oder „Phototechnische Platte B“ ist die Zwischenschaltung eines Blaufilters nicht unbedingt nötig.

Zu Beginn der Versuche stellte sich heraus, daß der analytische Rotor XX bei 40 000 U/M manchmal während des Versuches mit dem Schlepplager wanderte oder vibrierte. Ich habe daher nach sehr sorgfältiger Feststellung der tatsächlichen Lage des Drehzentrums das Schlepplager und damit den Rotor durch Einzwängen eines Pertinaxringes zwischen Schlepplager und Auflageplatte unverrückbar festgelegt. Seither läuft der Rotor XX wie auch der neue Rotor XXI völlig vibrationsfrei. Aus Sicherheitsgründen sollte der Rotor XX mit höchstens 40 000 U/M betrieben werden. Damit wird ein mittleres Schwerefeld von etwa 115 000 g erzielt, was aber zur Sedimentierung und Trennung niedermolekularer Proteine (unter etwa 30 000) nicht ausreicht. Es wurde daher eine Rotor-Neukonstruktion vorgeschlagen und von der Phywe ausgeführt (s. Abb. 6). Diesen Rotor XXI (Gewicht 2665 g) habe ich in über 100 meist 3—4stdg. Versuchen bei 50 000 U/M mit bestem Erfolg erprobt. Bei 6,5 cm Radius bis zur Zellmitte erreicht man ein Schwerefeld von 180 000 g. Die schon früher beschriebenen Zellen³ aus Superpolyamid (Schichtdicke 12 mm) haben sich inzwischen sehr bewährt. Die Hauptzelle ist so leicht zu dichten, daß sie vor jedem Versuch auseinander genommen und gründlich gereinigt werden kann. Bisher ist auch keine einzige Quarzscheibe zerbrochen.

Die 6 Röhrchen des präparativen Rotors XI (Leergewicht 2660 g) haben ein Fassungsvermögen von $6 \times 7,5 = 45$ ccm. Er lief bei etwa 100 eigenen Versuchen, meistens jeweils 2—5 Stdn. bei 45—50 000 U/M (115—118 000 g) ohne Störungen. Als Röhrchen haben sich die schon früher³ beschriebenen aus Superpoly-

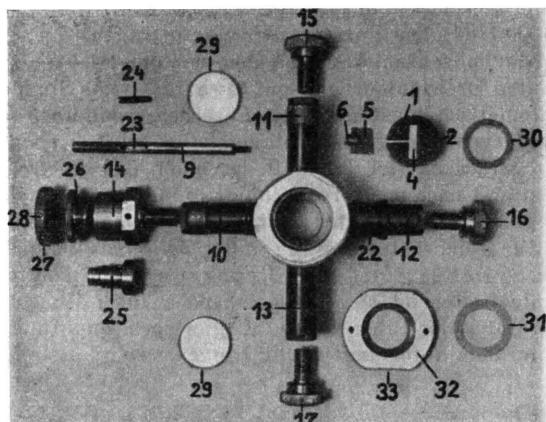


Abb. 1.

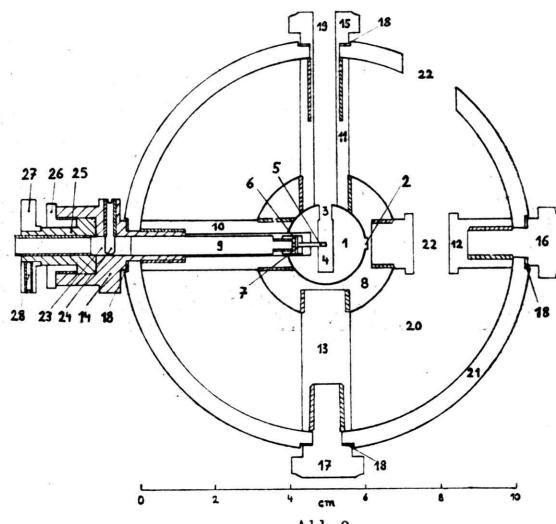


Abb. 2.

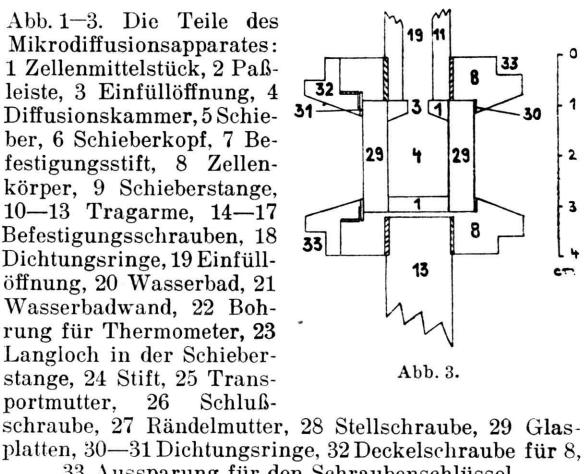


Abb. 1—3. Die Teile des Mikrodiffusionsapparates:
 1 Zellenmittelstück, 2 Paßleiste, 3 Einfüllöffnung, 4 Diffusionskammer, 5 Schieberkopf, 6 Schieberkopf, 7 Befestigungsschraube, 8 Zellenkörper, 9 Schieberstange, 10—13 Tragarme, 14—17 Befestigungsschrauben, 18 Dichtungsringe, 19 Einfüllöffnung, 20 Wasserbad, 21 Wasserbadwand, 22 Bohrung für Thermometer, 23 Langloch in der Schieberstange, 24 Stift, 25 Transportmutter, 26 Schlußschraube, 27 Rändelmutter, 28 Stellschraube, 29 Glasplatten, 30—31 Dichtungsringe, 32 Deckelschraube für 8,
 33 Aussparung für den Schraubenschlüssel.

³ G. Bergold, Kolloid. Z. 102, 292 [1943].

amid, besonders die Type A ausgezeichnet bewährt, die 50 000 U/M ohne Formveränderung ertragen.

Die Tourenzahl kann mit dem von der Phywe gebauten Drehzahlenregler auf etwa 0,2% viele Stunden automatisch konstant gehalten werden, wenn über das Reglerventil ein Umweg eingeschaltet wird, der ständig gerade so viel Treibluft durchläßt, daß die Drehzahl erst nach mehreren Minuten abfällt, wodurch das Reglerventil nur selten Luft zuschalten muß.

Zur Temperaturmessung in der Zelle habe ich nach Th. Svedberg und K. O. Petersen⁴ eine Thermosäule bestehend aus 5 freistehenden Eisen-Konstantan-Lötstellen über einem Kupferblech unmittelbar unter dem Rotor angebracht. Die anderen 5 Lötstellen

temperatur innerhalb einer Stunde um mehr als 1° ansteigt. Bei der hier beschriebenen Ultrazentrifuge erwärmt sich bei einer Raumtemperatur von etwa 20° der Rotor XXI innerhalb von 3—5 Std. bei 50 000 U/M höchstens auf etwa 22—24°.

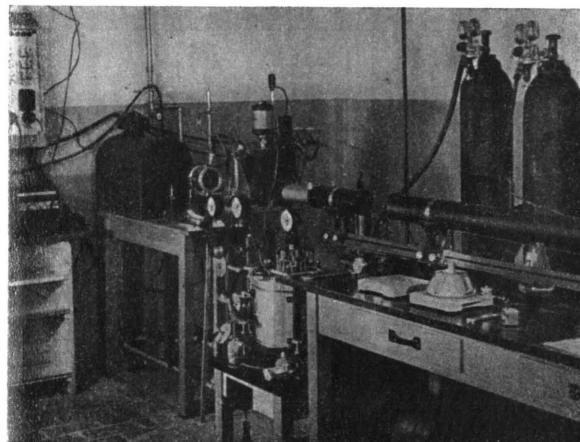


Abb. 4. Gesamtaufnahme der Ultrazentrifugen- und Diffusionsapparatur.

liegen wärmeträg isoliert in einem Höppler-Ultrathermostaten, der auf 20,00° eingestellt ist. Die Messung erfolgt mit einem Multiflex-Galvanometer MG 1 (B. Lange) auf etwa 0,05° genau. Gute Übereinstimmung der Temperatur der rotornahen Zone mit der Zellentemperatur im Rotor wurde durch Beobachtung des Schmelzens von Diphenylmethan festgestellt. In Anlehnung an die Arbeitsweise von Svedberg und Pedersen⁵ lasse ich den Rotor nicht im Hochvakuum laufen, sondern pumpe während des ganzen Versuches ständig reinen Wasserstoff mit einem Druck von etwa 3—5 mm Hg durch die Zentrifuge, wodurch die entstehende Wärme sofort abgeführt wird. Die Verwendung von Wasserstoff ist wegen der geringen Reibung und der guten Wärmeleitung des Wasserstoffs notwendig, um Konvektionsströme in der Zelle, die die Messung der Sedimentationskonstanten unmöglich machen, zu vermeiden. Diese treten leicht auf, wenn die Rotor-

⁴ Die Ultrazentrifuge. Hdbch. d. Koll. Wiss. Bd. VII. Verlag Steinkopff, Dresden und Leipzig [1940].

⁵ K. O. Pedersen, „Kinetik disperser Systeme“ und „Ultrazentrifugierung“ in Kolloidchemisches Taschenbuch von A. Kuhn, Leipzig, Akad. Verlagsges. 1944.

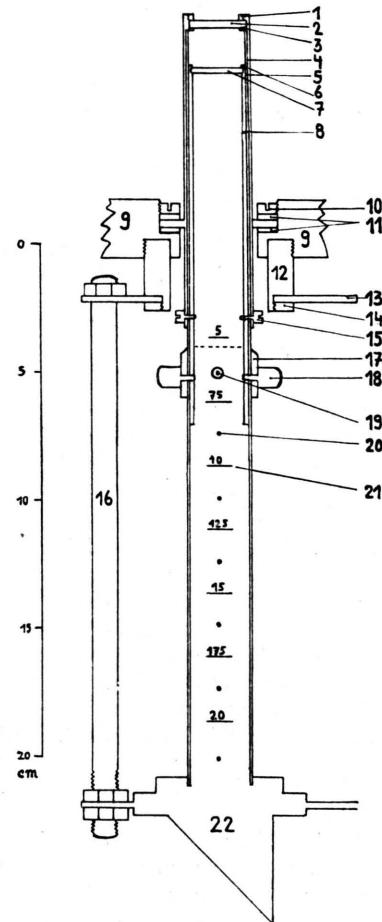


Abb. 5. Skalenträger für die Ultrazentrifuge, Schnitzeichnung: 1 Schraubenring zum Festhalten der Glasplatte, 2 planparallele Glasplatte, 3 Dichtungsring, 4 Vakuumstutzen reicht bis knapp unter den Rotor, 5 Schlitzrohr mit 2 mm Vertikalschlitz im unteren Teil, 6 Schraubenring zum Festhalten der Skala, 7 Skala mit Aussparungen zum Luftdruckausgleich; bei entsprechender Stellung von 17 genau 5 cm von der Mitte der Zelle im Rotor entfernt, 8 Skalenrohr, 9 Zentrifugeboden, 10 Schraubenring, 11 Dichtungsringe, 12 Befestigungsstutzen, 13 Trägerplatte, 14 Schraubenring, 15 vier Schrauben zum Verstellen des Schlitzrohres und damit des Skalenrohres gehen durch einen Horizontalsschlitz im Vakuumstutzen und halten mit Gewinde das Schlitzrohr in der gewünschten Stellung fest, 16 Verstrebungen, 17 Halter zum Verschieben der Skala, 18 Rändelschrauben gehen durch den Vertikalschlitz des Schlitzrohres und sitzen mit Gewinde im Skalenrohr, 19 Stift mit Feder zum Einrasten, 20 Versenkungen für 19, 21 genaue Einteilung, 22 Trägerplatte mit Prisma.

3. Die Auswertung der Skalenaufnahmen

Der Konzentrationsgradient beim Diffusions- oder Sedimentationsversuch wird am besten nach der sehr genauen Skalenmethode von O. Lamm⁶ gemessen. Hierbei wird während des Versuches eine Skala mit äquidistanten Teilstrichen durch den zwischen Skala und Objektiv befindlichen Gradienten hindurch projiziert. Im Bild erscheinen dann die Striche verschoben infolge der dem Konzentrationsgradienten proportionalen Ablenkung des Lichts.

Die Lageverschiebungen (Z) werden nun gegen den Diffusionsweg (z) (Abb. 8) bzw. den Sedimen-

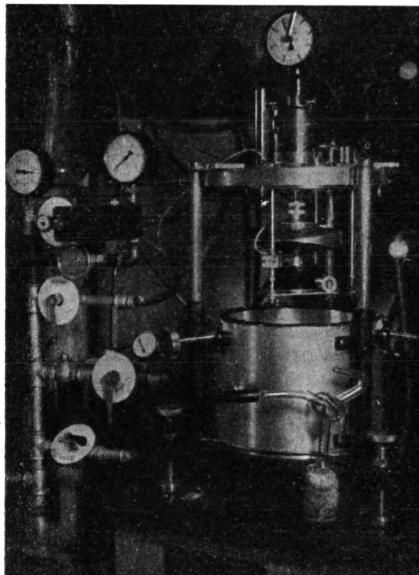


Abb. 6. Ultrazentrifugenapparatur mit RotorXXI.

tationsweg (z) (Abb. 7) aufgetragen und man erhält so die Diffusions- bzw. die Sedimentationsgradientenkurve.

Die Skalenaufnahmen wurden genau nach der von O. Lamm⁶ angegebenen Weise mit einem Zeiß-Meßmikroskop (CG Meßgenauigkeit etwa 0,01 mm) ausgemessen und ausgewertet. Hierbei habe ich jedoch bei Sedimentationsversuchen auf eine Markierung des Radius durch ein kleines

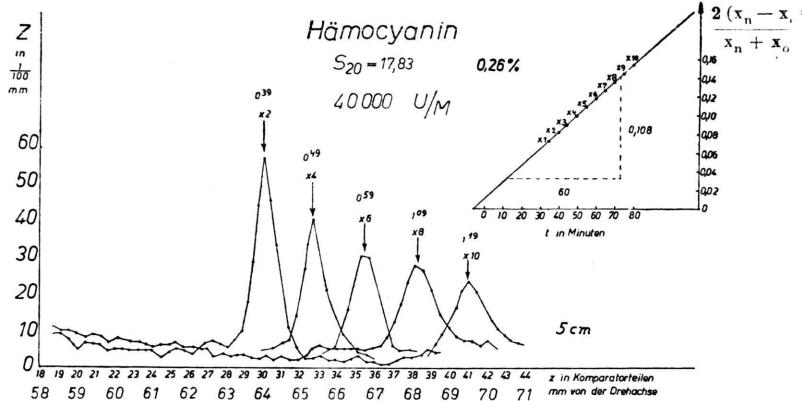


Abb. 7. Sedimentationsdiagramm und graphische Ermittlung von S_{20} .

Loch in der Blindzelle verzichtet. Bei der völlig mit der zu untersuchenden Substanz gefüllten Zelle (ohne Paraffinölschicht) ist der Beginn der Zelle durch den ersten sichtbaren Skalenstrich markiert, wobei der dadurch mögliche Fehler der Abstandsbestimmung durch den Skalenstrichabstand (0,2 mm) bedingt ist und unter 0,3% bleibt. Die Diffusionskonstante wurde fast immer nach der einfachen, bekannten Gleichung

$$D = \frac{x_{wp}^3}{2t}$$

bestimmt, wobei x_{wp} der Abstand des Wendepunktes der Gradientenkurve (in Abb. 8 durch kurze

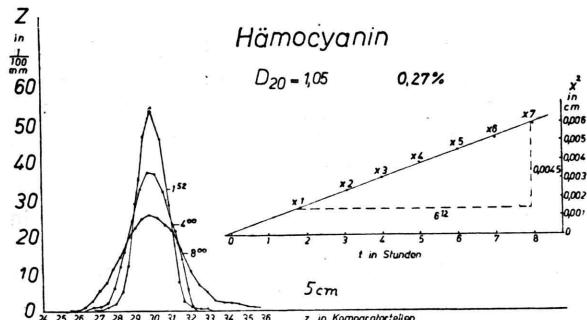


Abb. 8. Diffusionsdiagramm und graphische Ermittlung von D_{20} .

waagrechte Striche gekennzeichnet) von der ursprünglichen Lage der Schichtgrenze ist. Die Ordinate des Wendepunktes ist bei Annahme einer Gaußschen Glockenkurve definiert durch

$$\frac{H_{\max}}{\sqrt{e}}$$

wobei H_{\max} die maximale Ordinatenhöhe der Gradientenkurve ist. Die auf diese Weise ermittelten Dif-

⁶ „Refraktionsmethoden“ in „Die Ultrazentrifuge“, siehe ⁴.

fusionskonstanten der zeitlich verschiedenen Aufnahmen eines Versuches streuen sehr wenig, was auch von früheren Untersuchern hervorgehoben wird^{1, 7, 8}. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, daß man bei der relativ hohen Lage des Wendepunktes einer Diffusionskurve immer zugunsten des meistens gesuchten hochmolekularen Stoffes mißt und an dieser Stelle die Diffusionskurve nicht mehr von den sehr oft vorhandenen, schneller diffundierenden kleineren Anteilen überlagert wird.

Zur Bestimmung von s_{20} wird am besten das Wandern des 50%-Punktes der Sedimentationsgradientenkurve verfolgt, wobei die Lage des 50%-Punktes durch den Gipfelpunkt der Gradienten-

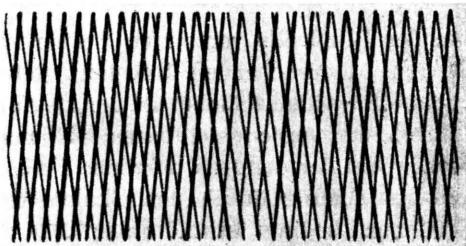


Abb. 9. Die Sichtbarmachung einer Sedimentations-Konzentrationsgradientenkurve nach dem Moiré-Prinzip. Man erkennt deutlich an den Kreuzungspunkten der Linien von Referenz- und Versuchsskala den Verlauf der Kurve.

kurve definiert ist (in Abb. 7 durch senkrechte Pfeile gekennzeichnet).

Die Mittelwerte von $d \ln x/dt$ bzw. x^2/t bei den etwa 8–10 Sedimentations- bzw. Diffusionsaufnahmen haben wir immer graphisch ermittelt. Hierzu werden bei der Sedimentation die aus den für die Temperatur korrigierten Sedimentationswegen x_2 gebildeten Ausdrücke $\left(\frac{2(x_n - x_o)}{x_n + x_o} \right)$ gegen die Zeit (t) aufgetragen (Abb. 7; x_n Abstand des n -ten Gipfelpunktes von der Drehachse, x_o Abstand von der Drehachse zum Meniskus bzw. Beginn der Zelle). Bei der Diffusion werden die Quadrate der Diffusionswege (x^2) gegen die Zeit (Abb. 8) aufgetragen und nun die best angepaßte Gerade durch die Punkte gezogen. Auf diese Weise wird man unabhängig vom tatsächlichen Diffusionsbeginn, der bei kleinen Störungen manchmal nicht mit dem theoretischen Diffusionsbeginn (Schieberöffnung) übereinstimmt. Ferner erkennt man

⁷ A. Polson, Kolloid. Z. 87, 149–181 [1939].

⁸ S. Brohult, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis IV, Vol. 12, No. 4, 1–69 [1940].

bei dieser graphischen Mitteilung sehr leicht Störungen des Versuchsverlaufs durch Konvektionsströmungen oder Veränderung der Diffusionskonstanten in Abhängigkeit von der Zeit. Über weitere Vorteile, z. B. beim Vergleich der Sedimentationskurve mit der theoretischen Diffusionskurve zur Prüfung der Einheitlichkeit einer Substanz, soll an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

Die Berechnung des Molekulargewichtes erfolgte nach der von Svedberg⁴ angegebenen Fundamentalgleichung

$$M = \frac{R T s_{20}}{D_{20}(1 - V_0 \varrho)} .$$

M Molekulargewicht, R Gaskonstante, T abs. Temperatur, s_{20} Sedimentationskonstante bei 20°, 1 Svedberg = 10^{-13} cm sec $^{-1}$ dyn $^{-1}$, D_{20} Diffusionskonstante bei 20° cm 2 sec $^{-1}$, V_0 [cm 3 g $^{-1}$] partielles spezif. Volumen der nicht solvatisierten Substanz, ϱ [cm $^{-3}$ g] Dichte der Lösung.

Es ist

$$s_{20} = \frac{1}{x \omega^2} \frac{dx}{dt} .$$

x Abstand der Substanzgrenze vom Drehzentrum, t Zeit, ω Winkelgeschwindigkeit.

Bezüglich weiterer Berechnungsmöglichkeiten sei auf die sehr übersichtliche Zusammenstellung von R. Markham, K. M. Smith und D. Lea⁹ verwiesen.

4. Die Moiré-Methode

Den vielen Vorteilen der Skalenmethode von Lamm stehen als Nachteile die nicht sehr anschauliche Beobachtungsmöglichkeit während des Versuches und das sehr langwierige Auswertungsverfahren gegenüber. Es haben daher viele Untersucher Verfahren ausgearbeitet, die die direkte Beobachtung der Konzentrationsgradientenkurve gestatten. Leider sind diese Methoden kompliziert und nicht sehr genau⁵. In Zusammenarbeit mit Hrn. Dr. W. Zimmermann vom Ammoniaklabor der I.G. Farbenindustrie A.G. Ludwigshafen habe ich jedoch eine Methode ausgearbeitet, die auf sehr einfache Weise die Gradientenkurve sichtbar macht. Hierzu wird lediglich eine schwache Zylinderlinse auf das Kameraobjektiv aufgesetzt, wodurch die Skalenlinien in der Mattscheibenebene auf etwa 3 cm verlängert werden. Nun wird einmalig mit der Zylinderlinse eine Art Referenzskala des gradientenlosen Lösungsmittels (meist Wasser) aufgenommen. Bei dem Hauptversuch kreuzt

⁹ Parasitology 34, 315–352 [1942].

Hämocyanin von <i>Helix pomatia</i>				Hämocyanin Spaltkomponente ($\frac{1}{8}$)			
0,26% in $\begin{cases} 0,085\text{-}m. \text{Na-Aacetat} \\ 0,015\text{-}m. \text{CH}_3\text{COOH} \end{cases}$		0,27% in $\begin{cases} 0,2\text{-}m. \text{NaCl} \\ 0,068\text{-}m. \text{Na-Aacetat} \\ 0,012\text{-}m. \text{CH}_3\text{COOH} \end{cases}$		0,55% in $\begin{cases} 0,2\text{-}m. \text{NaCl} \\ 0,017\text{-}m. \text{KH}_2\text{PO}_4 \\ 0,013\text{-}m. \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \end{cases}$		0,26% in $\begin{cases} 0,2\text{-}m. \text{NaCl} \\ 0,017\text{-}m. \text{KH}_2\text{PO}_4 \\ 0,013\text{-}m. \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \end{cases}$	
pH 5,48		pH 5,36		pH 8,28		pH 8,28	
Werte von Brohult ⁸		Eigene Werte		Werte von Brohult ⁸		Eigene Werte	
Versuchszeit in Std.	$D_{20} \cdot 10^7$ *	Versuchszeit in Std.	$D_{20} \cdot 10^7$ *	Versuchszeit in Std.	$D_{20} \cdot 10^7$ *	Versuchszeit in Std.	$D_{20} \cdot 10^7$ *
45,9	1,12	2,01	1,071	48,8	1,73	1,60	1,815
57,8	1,00	3,14	1,076	66,8	1,73	2,15	1,895
81,9	1,01	4,09	1,105	73,8	1,58	3,00	1,846
93,7	1,09	5,09	1,091	137,9	1,68	4,00	1,831
	1,06	6,09	1,060		1,68	5,00	1,710
	Mittelwert	7,09	1,045		Mittelwert	5,30	1,820
		8,09	1,046			6,00	1,901
			1,056			6,30	1,774
			Mittelwert			7,00	1,746
						7,30	1,815
							1,815
							Mittelwert

* Korr. für 20° und Wasserviscosität.

Tab. 1

Myosin S aus Kaninchen-Muskulatur **		Pferdeserumalbumin kryst. ***		Rohrzucker		NaCl	
0,29% in $\begin{cases} 0,567\text{-}m. \text{KCl} \\ 0,034\text{-}m. \text{KH}_2\text{PO}_4 \\ 0,128\text{-}m. \text{K}_2\text{HPO}_4 \end{cases}$		0,43% in 0,2-m. NaCl		1% in aqua bidest.		1% in aqua bidest.	
pH 6,98		pH 5,5					
Versuchszeit in Std.	$D_{20} \cdot 10^7$ *	Versuchszeit in Std.	$D_{20} \cdot 10^7$ *	Versuchszeit in Std.	$D_{20} \cdot 10^7$ *	Versuchszeit in Std.	$D_{20} \cdot 10^7$ *
2,39	0,3858	0,30	6,68	0,07	47,4	0,06	126,0
3,09	0,3750	0,40	6,69	0,12	43,2	0,09	123,9
3,54	0,3240	1,00	6,53	0,18	40,7	0,14	126,0
4,39	0,3090	1,15	6,37	0,22	54,3	0,19	122,0
5,39	0,3308	1,30	6,58	0,27	45,5	0,24	136,8
6,39	0,3295	2,00	6,81	0,32	47,8	0,29	137,3
7,39	0,3380	2,30	6,33	0,37	49,2	0,34	134,3
8,39	0,3489	3,00	6,67	0,42	50,4	0,39	128,7
10,09	0,3318	3,32	6,49	0,52	45,8	0,44	127,2
11,39	0,3002	4,30	6,43	1,02	46,8	0,49	127,8
	0,3373		6,55		47,1		129,0
	Mittelwert		Mittelwert		Mittelwert		Mittelwert
	(6,1) ⁴				(45,6) ⁷		

* Korr. für 20° und Wasserviscosität, rechnerisch ermittelt.

** Das Myosin S haben wir für Hrn. Prof. H. H. Weber aus Königsberg untersucht.

*** Das Pferdeserum-Albumin wurde uns freundlicherweise von Hrn. Dr. Schultze von den Behring-Werken, Marburg, überlassen.

Tab. 2

man nun in der Mattscheibebene durch Drehen der Platte die durch die aufgesteckte Zylinderlinse verbreiterte Gradientenskala mit der gradientenlosen und man sieht als Moiré-Figur die durch

die Kreuzungspunkte markierte Konzentrationsgradientenkurve (s. Abb. 9). Ich benutze diese Moiré-Methode seit 1942 zur Beobachtung sowohl der Sedimentation wie der Diffusion; natur-

Substanz *	Gelöst und dialysiert gegen	pH	c%	Spezif. Volumen V ₀	s ₂₀ in Svedberg	D ₂₀ · 10 ⁷	f/f ₀ *	Molekulargewicht aus s ₂₀ u. D ₂₀ M _s
Hämocyanin von <i>Helix pomatia</i>	0.2-m. NaCl 0.068-m. Na-Aacetat 0.012-m. CH ₃ COOH	5.86 (5.48)	0.27 (0.26 D) (0.25 s) (0.0) **	0.738	98.00 (100.30) ⁸ (103.00) ⁸	1.051 (1.060) ⁸ (1.070) ⁸	1.48 (1.45) ⁸ (1.45) ⁸	8.670.000 (9.338.000) ⁸ (8.910.000) ⁸
Hämocyanin Spaltkomponente	0.2-m. NaCl 0.017-m. KH ₂ PO ₄ 0.013-m. Na ₂ B ₄ O ₇	8.28	0.26 (0.55 D) (0.24 s) (0.0) **	0.738	17.83 (17.3) ⁸ (19.7) ⁸	1.81 (1.77) ⁸ (1.77) ⁸	1.86 (1.79) ⁸ (1.79) ⁸	916.000 (909.000) ⁸ (1.030.000) ⁸
Edestin kryst.	1.0-m. NaCl 0.005-m. HCl 0.01-m. Na ₄ P ₂ O ₇	7.8	0.25	0.744	13.10 (12.80) ⁴	4.14 (3.93) ⁴	1.15 (1.21) ⁴	300.000 (310.000) ⁴
Pferdeserumalbumin 8mal umkryst.	0.2-m. NaCl	5.5	0.43	0.748	4.58 (4.46) ⁴	6.42 (6.1) ⁴	1.21 (1.27) ⁴	68.900 (70.000) ⁴
Enolase kryst.	0.112-m. NH ₄ OH 0.1-m. CH ₃ COOH	8.1	0.45	0.735	5.59	8.08	1.01	63.700 (64.000) ¹¹
Insulin kryst.	0.04-m. Na ₂ HPO ₄ 0.04-m. KH ₂ PO ₄ 0.2-m. NaCl	6.6	0.36 0.36 (1.0 s) (0.5—1.0 D)	0.749	3.68 3.67 (3.55) ^{9a}	7.41 7.48 (7.53) ^{9a}	1.18 (1.13) ^{9a}	47.800 (46.000) ^{9a}
Humanserum Albuminkomponente	verdünnt 1 + 7 mit 1% NaCl	s ₂₀	(4.44) ⁴ ; 4.36; 4.31; 4.35; 4.25; 4.42; 4.51; 4.50; 4.50; 4.45.					

* Für die Überlassung der Substanzen sage ich besten Dank Hrn. Dr. Th. Bücher vom Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem, für das Edestin und die Enolase; Hrn. Dr. Schultze von den Behring-Werken, Marburg, für das Pferdeserumalbumin, und Hrn. Dr. Lindner von der I.G. Farbenindustrie A.G. Höchst für das Insulin. Das Hämocyanin wurde durch Herzpunktion gewonnen und

gegen die betreffenden Puffer dialysiert; das Humanserum wurde nach Absitzen des Blutkuchens durch Zentrifugieren auf einer gewöhnlichen Laborzentrifuge gewonnen.

* f/f₀ = mol. Reibungswiderstand dividiert durch mol. Reibungswiderstand kugelförmiger Moleküle gleichen Volumens.

** Für unendliche Verdünnung extrapoliert.

Tab. 3

gemäß läßt sie sich auch bei anderen Apparaturen, die mit der Skalenmethode arbeiten, anwenden. Es wird z. Zt. geprüft, ob sich die Moiré-Methode auch für eine quantitative Auswertung eignet, dadurch, daß man die verbreiterten, gekreuzten Skalen mit Hilfe eines Projektionsapparates vergrößern und an den Kreuzungsstellen der Linien den Kurvenverlauf direkt auf Millimeterpapier markieren kann, wodurch das ganze mühevolle Ausmessen der Skalen wegfällt.

5. Ergebnisse

Aus den Tabellen 1—3 ersieht man, daß die eigenen Werte der Diffusionskonstanten (D₂₀) von einer Reihe Eichsubstanzen sehr gut mit den Werten anderer Untersucher (in Klammern) übereinstimmen. Ferner ist aus Tab. 1 und 2 zu erkennen, daß bei exakter Arbeitsweise mit der beschriebenen Mikro-Diffusionsapparatur Versuchszeiten von 3

bis 12 Stdn. genügen und die langen Versuchszeiten von 12 Stdn. bis 1 Woche, die O. Lamm^{1, 6}, O. Lamm u. A. Polson¹⁰, A. Polson⁷ und S. Brohult⁸ angeben, nicht notwendig sind. Der Meßbereich der eigenen Diffusionsapparatur ist sehr groß, da Diffusionskonstanten von etwa 0,3 — etwa 130 · 10⁻⁷ cm²/sec bestimmt werden konnten, wie aus den Tab. 1—4 zu ersehen ist^{10a}. Dies entspricht einem Partikel- bzw. Molekulargewicht von etwa 10⁷—10². Die Genauigkeit einer einzelnen D₂₀-Messung beträgt etwa ± 3—5%. Innerhalb dieser Fehlergrenze sind wiederholte Messungen mit derselben Substanz reproduzierbar. Für eine einzelne Messung mit der abgeänderten Mikro-

^{9a} G. L. Miller u. K. J. I. Andersson, J. Biol. Chem. 144, 459—464 [1942].

¹⁰ Biochemical J. 30, 528—541 [1936].

^{10a} Inzwischen konnte die Diffusionskonstante des Polyeder-Virus (Molekulargewicht 8 · 10⁸—10⁹) mit etwa 0,17 · 10⁻⁷ cm² sec⁻¹ bestimmt werden.

Substanz *	Gelöst in	pH	c ⁰ / ₀	Spezif. Volumen V ₀	s ₂₀ in Svedberg	D ₂₀ · 10 ⁷	f/f ₀	Molekulargewicht aus s ₂₀ u. D ₂₀ M _s
Myosin-S	0.567-m. KCl 0.0346-m. K ₂ HPO ₄ 0.128-m. K ₂ HPO ₄	6.98	0	(0.749)	93.0	0.52	2.3	17.240.000
Myosin-L	0.55-m. KCl 0.03-m. Na ₂ HPO ₄ 0.03-m. KH ₂ PO ₄	6.50	0	(0.749)	6.67	0.45	6.3	1.446.000
γ-Globulin	0.9% NaCl	~ 7.0	0.4	(0.745)	7.0	3.01	1.6	222.000
Phosphatase (Prostata)	0.0096-m. HCl 0.014-m. sek. Natriumcitrat	~ 4.2	0.1—0.4	(0.749)	4.01 **	1.83 **	2.9 **	212.500 **
Oxydierendes Ferment, kryst.	0.035-m. Na ₂ P ₂ O ₇ 0.01-m. H ₂ SO ₄	7.8	0.66	(0.745)	6.96	4.18	1.3	159.000
Hochgereinigt. Serumalbumin (Rind)	0.03-m. Na ₂ HPO ₄ 0.03-m. KH ₂ PO ₄	6.8	0.8	(0.749)	4.72	5.50	1.3	83.000
A-Substanz	0.2-m. NaCl	~ 7.0	0.5	0.695	3.58	3.93	2.0	73.000
Prolactin	NaOH + HCl	6.5	1.0	(0.749)	3.05	—	—	—
Chymotrypsin kryst.	n/10-CH ₃ COONa n/10-CH ₃ COOH	5.0	0.68	(0.751)	2.74	4.14	1.9	64.500
Polyeder-Spaltprodukt	n/2-NaOH	~ 13	0.51	(0.749)	1.19	7.49	1.7	15.400
Trypsin kryst.	n/10-CH ₃ COOH n/10-CH ₃ COONa	5.0	0.29	(0.751)	1.69	10.95	1.2	15.100
Nucleinsäure Handelsware III	0.1-m. NaHCO ₃	~ 8.2	0.8	0.594	2.28	11.58	1.3	11.790
Cobratoxin gereinigt	H ₂ O	—	0.8	(0.749)	—	23.86	—	2.430 ***
Adenylnäure kryst.	0.1-m. NaHCO ₃	~ 8.2	0.8	(0.750)	—	39.1	—	550 *** (347) a
Rohrzucker	H ₂ O	—	1.0	(0.630)	—	47.8	—	358 *** (342) b
NaCl	H ₂ O	—	1.0	—	—	129.6	—	—

* Die angeführten Substanzen wurden in Zusammenarbeit mit folgenden Laboratorien untersucht: Die Myosine aus Kaninchenmuskel und das Serum-Albumin (Rind) für Hrn. Prof. Dr. H. H. Weber, Universität Königsberg; das γ-Globulin für Hrn. Dr. H. Hellmann, K.W.I. für Biochemie, Berlin-Dahlem; die Prostata-Phosphatase für Hrn. Doz. Dr. Ohlmeyer, Universität Tübingen; das oxydierende Ferment für Hrn. Dr. Th. Bücher, K.W.I. für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem; die A-Substanz aus Ejakulat für Hrn. Prof. Freudenberg, Universität Heidelberg; das Prolactin und die Nucleinsäure für Boehringer & Söhne,

Mannheim; das Chymotrypsin und Trypsin wurde uns freundlicherweise von Hrn. Dr. Schramm von unserer chemischen Abteilung überlassen, das Polyeder-Spaltprodukt stammt aus unserer Abteilung für Virusforschung des K.W.I. für Biochemie, Tübingen; das Cobratoxin für Hrn. Doz. Dr. Th. Wieland, K.W.I. für Medizin. Forschung, Heidelberg.

** Mittelwerte von drei verschiedenen Konzentrationen.

*** Nur aus D₂₀ berechnet: a) aus der Konstitutionsformel berechnet, b) mit anderen Methoden ermittelt.

Tab. 4

diffusionsapparatur sind je nach Konzentration nur einige mg Substanz bzw. etwa 0,6 ccm notwendig. Bei Skalenabständen von 5—20 cm können Konzentrationen von mehreren Prozent bis etwa 0,03% gemessen werden.

Die Sedimentationskonstanten (s₂₀ in Svedberg) mehrerer Eichsubstanzen sind in Tab. 3 zusam-

mengestellt. Die eigenen Werte stimmen sehr gut mit den Werten anderer Untersucher (in Klammern) überein.

Besonders hervorzuheben ist die Messung der Sedimentations- und Diffusionskonstanten der Enolase, da die Berechnung des Molekulargewichtes aus diesen beiden Konstanten den Wert von

63,700 ergab und sich später¹¹ herausstellte, daß bei der Enolase gerade 1 Mol Hg auf 64000 g Protein kommen. Es ist dies meines Wissens der einzige Fall eines zwingenden Beweises der Richtigkeit der von Svedberg⁴ angegebenen Fundamentalformel zur Berechnung des Molekulargewichtes aus den Absolutwerten von s_{20} und D_{20} .

Substanz*	Gelöst in	c %	s in Svedberg unkorrigiert
Polystyrol II 80	Methylisopropylketon	1,0	9,36 5,83
Periston KW 75	Wasser	0,25	3,17
Buna S 2	Toluol	1,0	0,6

* Die angeführten Substanzen haben wir für Hrn. Dr. J. Hengstenberg von der I.G. Farbenindustrie A.G. Ludwigshafen/Rh. untersucht.

Tab. 5

In Tab. 4 sind die Molekularkonstanten mehrerer Substanzen zusammengestellt, die aus etwa 400 Sedimentations- und 150 Diffusionsversuchen der 3½-jährigen Arbeit von Ende 1942 bis Anfang 1945 ausgewählt wurden. Die Sedimentationskonstanten einiger Kunststoffe sind aus Tab. 5 zu ersehen. Es ergibt sich daher, daß mit der umgebauten Ultrazentrifuge bei 50000 U/M Sedimenta-

¹¹ Th. Bücher, Angew. Chem. **56**, 328 [1943].

tionskonstanten bis herab zu etwa 0,6 Svedberg messbar sind, wenn die Diffusionskonstante klein ist. Bei rascher diffundierenden Substanzen, wie z. B. Hefenucleinsäure oder niedermolekularen Proteinen liegt die Grenze bei etwa 1,0 Svedberg, was einem Molekulargewicht von etwa 10000 bis 20000 entspricht. Die Fehlergrenze einer einzelnen s_{20} -Bestimmung beträgt etwa $\pm 2-3\%$. Innerhalb dieses Bereiches sind wiederholte Messungen mit der gleichen Substanz reproduzierbar. Bei Skalenabständen von 5—17,5 cm können Konzentrationen von einigen Prozent bis etwa 0,05% gemessen werden. Für eine einzelne Messung sind je nach Konzentration nur wenige mg Substanz bzw. etwa 0,8 ecm nötig, die aber fast zur Gänze wiedergewonnen werden können.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der I.G. Farbenindustrie A.G., Ludwigshafen a. Rh., durchgeführt, wofür an dieser Stelle gedankt sei. Inbesondere danke ich Hrn. Dr. J. Hengstenberg für seine große Hilfe bei der Einarbeitung in dieses Arbeitsgebiet. Frl. M. Vialon bin ich für ihre Hilfe bei den Ultrazentrifugen- und Diffusionsversuchen und Fr. U. John für die Auswertung der Skalenaufnahmen zu großem Dank verpflichtet. Hrn. Meister Betzler und Hrn. Fouquet von der feinmechanischen Werkstatt des Ammoniaklagers der I.G. Farbenindustrie A.G. Ludwigshafen danke ich bestens für ihre Hilfe beim Bau der Diffusionsapparatur und Umbau der Ultrazentrifuge. Hrn. Meister Bornemann von der Fa. Phywe, Göttingen, für seine Bemühungen um die Ultrazentrifuge im allgemeinen und für die Herstellung des Rotors XXI im besondern.

Chromosomenuntersuchungen an Insekten

Von ERICH WOLF

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Abt. H. Bauer, Hechingen

(Z. Naturforsch. **1**, 108—109 [1946]; eingegangen am 1. September 1945)

Bei der Bearbeitung der Spermatogenese einiger cytologisch noch unbekannter Arten wurden die folgenden Befunde gemacht, deren ausführliche Darstellung einer späteren Mitteilung vorbehalten bleiben muß.

Zur Frage der Verbreitung der typischen und der atypischen (chiasmafreien) Meiose bei Nematoceren¹ konnten Vertreter zweier weiterer, noch nicht bearbeiteter Familien untersucht werden:

¹ E. Wolf, Chromosoma **2**, 192 [1941].

1. *Liriope* (*Ptychoptera*) spec. (Fam. *Liriopidae*). Sie hat im ♂ (Spermatogonien) $2n = 10$ ($8 + XY$) Chromosomen. Die Autosomen sind als 4 Paare V-förmiger, etwas größeren verschiedener Chromosomen vorhanden, X als kleines V, Y als kurzes Stäbchen. Die ♂-Meiose folgt dem Normaltypus; es werden je Autosomenbivalent 1—2 Chiasmen gebildet. Auch die Geschlechtschromosomen sind zu einem Bivalent vereinigt, doch ließ sich nicht entscheiden, ob die Bindung durch Chiasmen erfolgt.