

## SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PRODUITS D'HYDROLYSE PEPSIQUE DES PROTÉINES

par

P. BOULANGER, G. BISERTE ET J. SWYNGEDAUF

*Institut de Recherches sur le Cancer et Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine,  
Lille (France)*

TISELIUS ET ERIKSSON-QUENSEL<sup>1</sup> ont étudié au moyen de la technique électrophorétique les produits de digestion pepsique de l'ovalbumine, en milieu acétique M/2 ou M/1. Avec la "Schlieren Methode" et en frontières descendantes, l'ovalbumine non digérée donne une seule frontière; après hydrolyse pepsique apparaît sur le diagramme un second composant qui migre plus lentement que le premier et qui correspond aux différents produits de dégradation de l'ovalbumine. Si l'on augmente la durée de l'action de la pepsine, on observe uniquement des changements dans les proportions relatives de ces constituants. Le fait qu'il n'existe pas de produits de dégradation intermédiaires est particulièrement intéressant: TISELIUS ET ERIKSSON-QUENSEL en déduisent que la pepsine agit suivant une loi du "tout ou rien". Ce n'est qu'après une électrophorèse prolongée que la seconde fraction plus lente, correspondant aux produits d'hydrolyse, se scinde elle-même en 3 composants de mobilités très voisines.

On sait d'autre part que les produits de digestion pepsique présentent des caractères physico-chimiques particuliers: notamment le pouvoir rotatoire spécifique est le même pour la grosse molécule protéique initiale et pour les fragments déjà très simplifiés (octopeptides) résultant de l'action de la pepsine<sup>2</sup>. L'étude de ces polypeptides doit donc permettre d'aborder avec succès le problème de la structure de la chaîne protéique\*.

Le fractionnement des produits de dégradation par la méthode ionophorétique est fréquemment utilisé, mais il a l'inconvénient d'être aveugle, et il semble bien préférable de contrôler optiquement la séparation (TISELIUS). L'électrophorèse permet ainsi de suivre la marche de la digestion pepsique et de repérer les différentes fractions; elle donne également la possibilité d'étudier isolément les divers groupes et de contrôler l'homogénéité des produits obtenus par d'autres procédés de fractionnement.

L'application de la technique électrophorétique aux hydrolysats enzymatiques est délicate (TISELIUS)<sup>3</sup>. En effet, la méthode est surtout bien adaptée aux grosses molécules ou en tout cas aux molécules qui agissent relativement peu sur la conductivité totale de la solution: ceci n'est pas le cas pour les polypeptides, qui, d'autre part, ont l'inconvénient d'être dialysables. Il est néanmoins possible, comme nous le verrons, d'obtenir des résultats satisfaisants et reproductibles d'une expérience à l'autre.

### A. PRÉPARATION DES PROTÉINES

Dans un premier temps, nous avons préparé des protéines électrophorétiquement homogènes; nous avons employé surtout la cristalbumine et l'ovalbumine.

\* Il faut évidemment tenir compte de la possibilité d'une resynthèse de polypeptides nouveaux par les agents enzymatiques.

1. *Ovalbumine*: les blancs d'œufs sont dilués au demi avec du sérum physiologique; on précipite à 52% de saturation en sulfate d'ammonium, on filtre et on précipite ensuite 3 fois au point isoélectrique ( $p_H$  4.6) (LONGSWORTH)\*; ces trois opérations suffisent à faire disparaître le composant  $C_1$  (conalbumine).

2. *Cristalbumine*: le sérum sanguin est précipité à 52% de saturation en sulfate d'ammonium neutralisé; après 1 heure de contact on centrifuge et on filtre; on ajoute au filtrat du sulfate d'ammonium cristallisé (15 g pour 500 ml) et on ajuste exactement à  $p_H$  4.7 par de l'acide acétique à 20%. Après une nuit de contact à 5°, on centrifuge 30 min; on reprend le précipité dans un volume d'eau égal à la moitié du volume de sérum dont on est parti, on précipite à 50% de saturation en sulfate d'ammonium et on ajuste à  $p_H$  4.8. On laisse quelques heures au repos, puis on centrifuge 40 min; on reprend le précipité dans un volume d'eau de moitié inférieur au volume précédent, on ajoute une même quantité de sulfate d'ammonium et on ajuste à  $p_H$  4.9. Au bout de 24 heures, on centrifuge 40 min et on reprend le précipité dans quelques centimètres cubes d'eau. On dialyse la bouillie ainsi obtenue dans un tube de cellophane, sous pression, d'abord 48 heures contre de l'eau courante, puis 48 à 72 heures contre de l'eau distillée. Après dialyse, on filtre pour enlever le précipité verdâtre qui s'est formé. On dose l'azote total et on dilue jusqu'à la concentration voulue.

Nous avons utilisé pour nos hydrolyses tantôt de la pepsine commerciale de titre élevé ( $T = 1.500$ ), tantôt cette même pepsine purifiée suivant la technique de PHILPOT<sup>6</sup>, jusqu'au stade précédant la cristallisation\*.

## B. HYDROLYSES PEPSIQUES ET FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE

Nous avons réalisé trois groupes d'expériences:

1. Hydrolyses pepsiques en milieux acétique, chlorhydrique ou sulfurique et électrophorèse consécutive sans modification du milieu; les solutions protéiques sont surmontées par une solution acide non tamponnée identique à celle qui a servi à la dialyse initiale.

2. Hydrolyses pepsiques en milieu sulfurique N/10; élimination quantitative de l'acide sulfurique par la baryte et ajustement de la solution à la même conductivité que le tampon utilisé pour l'électrophorèse.

3. Hydrolyses pepsiques en milieu phosphorique M/10; ajustement de la solution à un  $p_H$  et à une conductivité donnés; électrophorèse en milieu phosphatique ajusté au même  $p_H$  et à la même conductivité.

I. PREMIER GROUPE. Voici quelques exemples des résultats obtenus selon le premier mode opératoire.

*Essai P 32*: l'ovalbumine est dialysée 48 heures contre une solution de  $SO_4H_2$  N/50; concentration finale en protéine: 3%;  $p_H$  2.8; pepsine: 0.05 g pour 100 ml.

Diagrammes électrophorétiques (frontières descendantes).

a. Prélèvement initial: le tracé montre un seul constituant et une fausse-frontière ( $\epsilon$ );

b. Après 24 heures d'hydrolyse (à 37°): il existe deux systèmes de constituants, l'un correspondant à l'ovalbumine non digérée, l'autre, *hétérogène*, aux produits de digestion;

c. Après 48 heures d'hydrolyse: le tracé électrophorétique montre des variations dans les pourcentages relatifs des deux systèmes décrits précédemment; la fraction ovalbumine est très réduite tandis que celle qui correspond aux produits d'hydrolyse est beaucoup plus importante et se décompose en 3 accidents dont probablement une fausse-frontière médiane.

*Essai P 27*: ovalbumine à la concentration de 3%, dialysée contre HCl M/40 pendant 24 heures;  $p_H$  final: 3.0; pepsine: 0.05 g p. 100 ml; durée d'hydrolyse à 37°: 24 heures.

Diagrammes électrophorétiques (frontières ascendantes).

a. Prélèvement initial: l'ovalbumine est électrophorétiquement homogène;

b. Après 16 heures d'hydrolyse: le diagramme est constitué par 2 systèmes de composants dont l'un correspond à l'ovalbumine non digérée et l'autre, plus lent, aux produits de dégradation; l'électrophorèse prolongée révèle l'hétérogénéité de ces deux fractions;

c. Après 24 heures d'hydrolyse: la solution est dialysée dans un tube de cellophane, sous pression, contre de l'eau distillée (16 heures contre 120 ml, 7 heures contre 150 ml, 16 heures contre 130 ml, 6 heures contre 130 ml); les liquides extérieurs sont réunis et évaporés dans le vide à 37°, à 2 reprises.

\* Nous remercions vivement les Laboratoires O. BAILLY qui ont mis gracieusement à notre disposition les quantités importantes de pepsine nécessaires à notre expérimentation.

Le résidu est dissous dans du tampon phosphate M/20, de pH 5.82. Le diagramme électrophorétique (après 18000 secondes) est alors constitué par 3 systèmes de composants:  $\alpha$ ) un sommet très fin migrant vers l'anode;  $\beta$ ) un composant aigu migrant vers la cathode;  $\gamma$ ) un système dissymétrique central contenant une fausse-frontière;

d. Le liquide restant dans le tube de cellophane est dialysé 48 heures contre HCl N/40; le tracé ne comprend qu'un seul dôme dissymétrique; l'homogénéité de la protéine restante n'est donc pas parfaite et n'est plus comparable à celle de la protéine initiale; il faut noter que les dialyses ont été longues et ont pu modifier l'état de la molécule protéique.

L'ensemble des résultats précédents, obtenus avec l'ovalbumine, est donc comparable aux observations de TISELIUS. L'étude de la cristalbumine nous a fourni des indications supplémentaires.

*Essai P 24:* cristalbumine à la concentration de 2.2 g pour 100 ml, dialysée contre HCl N/40 pendant 24 heures; pH final: 3.0; pepsine: 0.045 g pour 100 ml; durée d'hydrolyse à 42°: 22 heures (après ce temps, l'intensité de la réaction du biuret effectuée sur le liquide de défécation trichloracétique est égale à celle que donne la solution protéique).

Diagrammes électrophorétiques (frontières descendantes) après 22 heures d'hydrolyse. Au bout de 900 secondes, on constate la présence d'un constituant très rapide migrant vers la cathode (Fig. 1). Après 15000 secondes, le tracé comprend un système dissymétrique médian migrant peu, formé d'une fausse-frontière et d'une petite fraction migrant vers l'anode.

*Essai P 42:* cristalbumine à la concentration de 2.80 g pour 100 ml, dialysée contre  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N/40 pendant 24 heures; pH final: 2.7; pepsine: 0.05 g pour 100 ml.

Diagrammes électrophorétiques (frontières descendantes). Après 6 heures d'hydrolyse, on note encore la présence, au bout de 1800 secondes d'électrophorèse, d'un constituant se dirigeant vers la cathode, et par conséquent très basique (Fig. 2).

Cette première série d'observations nous permet donc de penser qu'il existe dans les produits de dégradation des protéines par la pepsine plusieurs groupes "électrochimiquement" différents. Mais le mode opératoire suivi précédemment rend leur étude difficile: tout d'abord, l'absence de tampon amène des changements de pH aux frontières; d'autre part, les solutions ont une force ionique peu intense et il en résulte des variations sensibles de cette force ionique au niveau des frontières; enfin, on se trouve limité à une zone de pH trop étroite (2 à 3) et de ce fait on ne peut espérer séparer facilement les produits d'hydrolyse; en effet, le mode opératoire décrit dans l'essai P 27 est long et l'élimination complète de l'acide chlorhydrique difficile. C'est pourquoi nous avons entrepris une deuxième série d'expériences.

II. DEUXIÈME GROUPE. Nous avons essayé l'hydrolyse pepsique en milieu sulfurique N/10, suivie d'une précipitation quantitative de l'acide sulfurique par l'eau de baryte saturée. La solution est ensuite amenée à la conductivité de la solution tampon choisie, par addition d'une solution tampon de même pH, mais de molarité plus élevée.

*Essai P 21:* ovalbumine à la concentration de 2.6 g pour 100 ml en milieu sulfurique N/10; pH 1.7; pepsine: 0.05 g pour 100 ml. On effectue des prélèvements de 22 ml, auxquels on ajoute une quantité d'eau de baryte saturée exactement calculée. Après centrifugation, on vérifie le pH de la solution, qui doit être voisin de 7.0, et on ajoute une goutte d'eau de baryte; ce très léger excès de baryte ne gêne pas, car il sera éliminé ultérieurement à l'état de phosphate de baryum. On prépare alors une solution tampon de phosphate M/30, de pH 6.05, et une solution de phosphate M/2 de même pH. On mesure la conductivité de la solution protéique à la température de l'électrophorèse et on l'ajuste à la conductivité de la solution tampon M/30 au moyen de la solution phosphatique M/2, en se maintenant toujours à une température rigoureusement identique à celle de la première mesure. Au début de l'opération, il est nécessaire de centrifuger pour éliminer de phosphate de baryum. Les mesures de conductivité sont faites après l'addition de chaque goutte de solution phosphatique. Lorsqu'on arrive à des chiffres voisins de la conductivité de la solution tampon M/30, on ajuste avec une solution phosphatique de molarité plus faible (M/5 ou M/10).

Diagrammes électrophorétiques (frontières descendantes).

a. Prélèvement initial: on distingue sur le tracé (après 12000 secondes) un sommet dissymétrique correspondant aux protéines du blanc d'œuf (ovalbumine et un peu de conalbumine) avec une fausse-frontière peu marquée;



Fig. 1. Essai P. 24. Cristalbumine ( $pH = 2.18$ ; 22 heures d'hydrolyse pepsique).  
Durée de l'électrophorèse: 900 sec.



Fig. 2. Essai P. 42. Cristalbumine ( $pH = 1.80$ ; 6 heures d'hydrolyse pepsique).  
Durée de l'électrophorèse: 1800 sec.

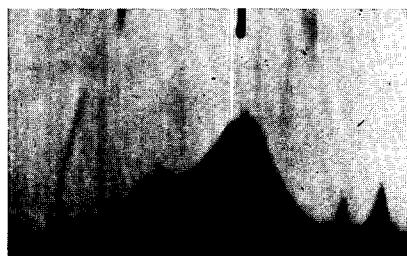


Fig. 3a. Essai P. 21. Ovalbumine ( $pH = 6.05$ ; 3 heures 30 d'hydrolyse pepsique en milieu sulfurique  $N/10$ ). Durée de l'électrophorèse: 12 000 sec.



Fig. 3b. Essai P. 21. Ovalbumine ( $pH = 6.05$ ; 3 heures 30 d'hydrolyse pepsique en milieu sulfurique  $N/10$ ). Durée de l'électrophorèse: 7 500 sec.

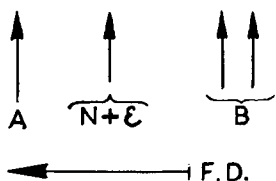
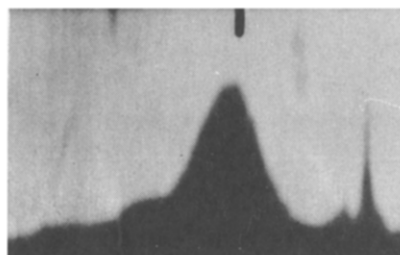


Fig. 4. Essai P. 21. Ovalbumine ( $pH = 6.05$ ; 24 heures d'hydrolyse pepsique en milieu sulfurique  $N/10$ ). Durée de l'électrophorèse: 15 000 sec.

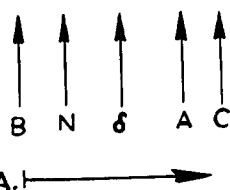
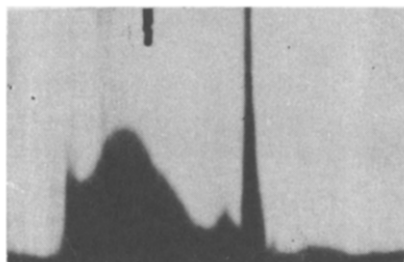
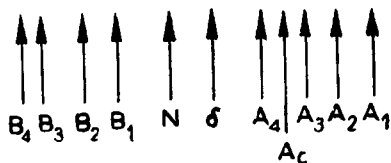
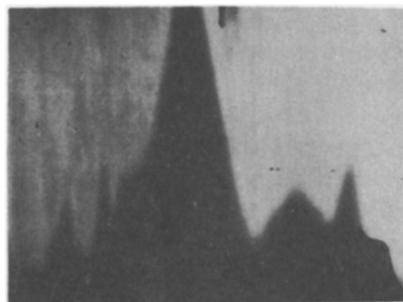
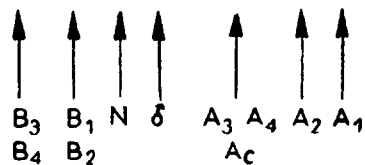
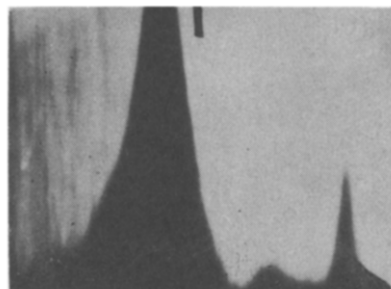


Fig. 5. Essai P. 23. Cristalbumine ( $pH = 9.6$ ; 24 heures d'hydrolyse pepsique en milieu sulfurique  $N/10$ ). Durée de l'électrophorèse: 15 000 sec.



F. A. →

Fig. 6. Essai P. 44. Cristalbumine ( $pH = 5.9$ ; 1 heure 30 d'hydrolyse pepsique en milieu phosphorique de  $pH = 2.0$ ). Durée de l'électrophorèse: 16 800 sec.



F. A. →

Fig. 7. Essai P. 44. Cristalbumine ( $pH = 5.9$ ; 48 heures d'hydrolyse pepsique en milieu phosphorique de  $pH = 2.0$ ). Durée de l'électrophorèse: 18 000 sec.

b. Après 3 heures et demie d'hydrolyse, l'aspect du tracé (au bout de 12000 secondes) est considérablement modifié: il comprend un système migrant vers la cathode, formé de 2 sommets très aigus (composants "basiques"), un système médian comportant une fausse-frontière, et un système migrant vers l'anode, dans lequel se trouve la protéine non digérée (Fig. 3a). Après 7500 secondes, le tracé ne comportait que 4 sommets: la fraction O étant l'ovalbumine, il y a donc des produits de digestion (peu abondants) qui migrent *en avant* de la protéine non digérée (Fig. 3b);

c. Après 24 heures d'hydrolyse, on observe des modifications dans les pourcentages relatifs des diverses fractions repérées dans le tracé précédent (Fig. 4) (15000 secondes).

Des essais analogues ont pu être réalisés à différents  $p_H$ . En voici un exemple à  $p_H$  9.6:

*Essai P 23:* ovalbumine à la concentration de 3 g pour 100 ml en milieu sulfurique N/10; pepsine 0.08 g pour 100 ml; électrophorèse en tampon pyrophosphate M/40 de  $p_H$  9.6 après ajustement de la solution protéique avec du pyrophosphate M/6 de même  $p_H$ .

Diagrammes électrophorétiques (frontières ascendantes).

a. Prélèvement initial: cristalbumine électrophorétiquement homogène (après 10500 secondes);

b. Après 24 heures d'hydrolyse, le tracé comporte 5 fractions, la plus rapide correspondant à ce qui reste de cristalbumine non digérée, les 4 autres aux produits de dégradation et à la fausse-frontière (Fig. 5) (15000 secondes).

Cette technique, révèle donc la présence, dans les produits d'hydrolyse pepsique, de 3 séries de constituants "électrochimiquement" distinctes. On peut cependant faire à cette manière de procéder deux sortes d'objections. Tout d'abord si la conductivité est ajustée de façon parfaite, il existe encore des différences de  $p_H$  entre le tampon et la solution protéique: il est donc impossible de faire des mesures exactes de vitesse. En second lieu, le sulfate de baryum peut entraîner par adsorption des fractions intéressantes, ainsi que le montrent les dosages d'azote et les essais couplés d'électrophorèse avec et sans précipitation barytique.

*Essai P 22.* Dosages d'azote: a) prélèvement initial: sans baryte 3.38 g pour 1000 ml; avec baryte 2.47 g pour 1000 ml; b) prélèvement après 24 heures d'hydrolyse: sans baryte 3.33 g pour 1000 ml; avec baryte 2.70 g pour 1000 ml.

*Essai P 32.* Ovalbumine dialysée contre  $SO_4H_2$  M/50. Une fraction est traitée par la baryte, centrifugée et réajustée ensuite à la même résistivité avec de l'acide sulfurique M/2. Une autre fraction est simplement ramènée à la même dilution par  $SO_4H_2$  M/50. Les tracés électrophorétiques sont semblables pour les prélèvements initiaux, mais les prélèvements en cours d'hydrolyse ne sont pas comparables: l'un donne un tracé formé de 4 fractions groupées en 2 systèmes de composants; l'autre (après précipitation barytique) ne comprend qu'un seul sommet dissymétrique.

Ces constatations nous ont amenés à notre troisième série d'expériences.

III. TROISIÈME GROUPE. L'hydrolyse pepsique est réalisée en milieu phosphorique. On neutralise une partie de cet acide par de la soude jusqu'au  $p_H$  voulu. On dilue la solution jusqu'à la conductivité compatible avec la méthode électrophorétique, et on prépare ensuite une solution tampon à partir d'acide phosphorique et de soude en procédant par tâtonnements pour l'amener au même  $p_H$  et à la même conductivité que la solution protéique.

*Essai P 44:* Cristalbumine à 3.80 g pour 100 ml: 50 ml;  $PO_4H_3$  M/2: 12.5 ml;  $p_H$  de la solution: 2.0; solution de pepsine purifiée: 2 ml\*.

Le prélèvement initial de 20 ml est amené à  $p_H$  5.0 par 2 ml de soude normale, puis dilué par de l'eau distillée jusqu'à un volume de 34 ml, ce qui donne une conductivité adaptée aux conditions expérimentales de l'électrophorèse. Par ailleurs, on prépare un mélange de  $PO_4H_3$  M/2 et de NaOH N/1 de  $p_H$  5.0 que l'on dilue ensuite pour obtenir la même conductivité que dans la solution

\* 1 ml de cette solution de pepsine ajoutée à 32 ml de sérum de cheval dilué au demi à  $p_H$  1.8 amène au bout de 2 heures à l'étuve à 37° l'égailisation des réactions du biuret effectuées sur la solution protéique et le défat trichloracétique.

protéique. Les prélèvements après 1 heure et demie d'hydrolyse, à pH 2.0 et à 42°, et après 48 heures à 37°, sont traités de la même façon, le pH final après addition de la soude normale étant ici de 5.9.

Diagrammes électrophorétiques (frontières ascendantes).

a. Prélèvement initial: le tracé ne comporte qu'une seule frontière; la protéine est donc électrophorétiquement homogène; d'autre part, on n'observe pas de fausse-frontière (10800 secondes);

b. Après 1 heure et demie d'hydrolyse, le diagramme électrophorétique est constitué, au bout de 16800 secondes, d'au moins 10 fractions groupées en un système médian et deux systèmes latéraux (Fig. 6).

Le système migrant vers l'anode comprend, par ordre de mobilité croissante, les fractions A<sub>1</sub>, A<sub>c</sub>, A<sub>2</sub>, — qui forment un dôme hétérogène, — A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub>. A<sub>c</sub> correspond à la protéine non digérée; A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub> sont des polypeptides qui, à pH 5.9, ont des charges électriques négatives; nous les désignons sous le nom de constituants "acides".

Le système médian se déplace très légèrement vers la cathode. Il comporte essentiellement des constituants que nous appelons "neutres" (N) et une fausse frontière  $\delta$ .

Le système migrant vers la cathode est formé par des polypeptides qui, à pH 5.9, ont des charges électriques positives: ce sont les constituants "basiques". On y distingue, par ordre de mobilité croissante, les fractions B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>.

c. Après 48 heures d'hydrolyse pepsique le diagramme électrophorétique (18000 secondes) comporte 6 fractions (Fig. 7); il s'est produit, notamment, une diminution importante du sommet correspondant à la protéine non digérée\*.

Le mode opératoire que nous venons de décrire n'est pas encore parfait car, pratiquement, il est impossible de ramener exactement au même pH et à la même conductivité les prélèvements successifs: de ce fait, on ne peut comparer les vitesses des fractions sur les tracés électrophorétiques aux différents stades de l'hydrolyse, ce qui rend naturellement plus difficile l'identification de ces fractions.

Néanmoins, l'exemple qui précède\*\* suffit à montrer les avantages de cette troisième technique sur les deux précédentes. Elle permet notamment une résolution plus complète des produits d'hydrolyse pepsique: les résultats ainsi obtenus présentent déjà par eux-mêmes un très grand intérêt; ils constituent d'autre part un guide précieux pour les recherches ultérieures, en orientant la mise en œuvre et en rendant possible le contrôle des autres méthodes de fractionnement et d'isolement.

## CONCLUSION

L'électrophorèse différentielle des produits d'hydrolyse pepsique de l'ovalbumine et de la cristalbumine permet l'identification de plusieurs fractions ayant des mobilités électrophorétiques différentes. A pH 5.9 il n'y a pas moins de 10 fractions, dont 9 correspondent à des polypeptides et se répartissent en trois groupes que, suivant le sens de leur déplacement, nous avons qualifiés respectivement de *basique* (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, et B<sub>4</sub>), *neutre* (N) et *acide* (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, et A<sub>4</sub>). Ces comportements distincts doivent être attribués très vraisemblablement à la présence, dans les chaînes polypeptidiques, de radicaux amino-acides ayant des charges électriques différentes. Il est intéressant de rapprocher ces divergences de la similitude de certaines propriétés physico-chimiques de ces polypeptides (poids moléculaire, pouvoir et dispersion rotatoires, réaction du biuret) (voir page 2). Nous avons observé accessoirement, dans les premiers stades de l'hydrolyse

\* L'intensité de la réaction du biuret du défécât trichloracétique est, à ce moment, presque égale à celle de la solution protéique: 0.88/1.

\*\* Nous n'avons pas jugé bon de multiplier les exemples pour ne pas surcharger notre texte; les résultats obtenus au cours des différentes expériences sont tout à fait superposables pour le même pH de 5.9; parfois la présence d'une fausse-frontière, difficilement évitable, rend plus malaisée l'interprétation des clichés. Les essais effectués à d'autres pH (3.8 et 5.0) aboutissent à un fractionnement analogue, mais naturellement avec une répartition un peu différente des composants.

pepsique de la cristalbumine, la libération d'un constituant très basique qui paraît caractéristique de cette protéine.

### RÉSUMÉ

La séparation électrophorétique des produits d'hydrolyse pepsique des protéines a été effectuée suivant 3 modes opératoires:

1. Hydrolyse pepsique en solution acétique N/2 ou N/1, chlorhydrique ou sulfurique N/40, N/50; électrophorèse consécutive dans les mêmes milieux non tamponnés: les produits d'hydrolyse migrent plus lentement que la protéine intacte; la séparation des divers constituants polypeptidiques est difficile.

2. Hydrolyse pepsique en milieu sulfurique N/10, élimination quantitative de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  par la baryte et ajustement de la solution à a même conductivité que le tampon utilisé pour l'électrophorèse: la zone de  $\text{pH}$  étudiée est plus grande et la séparation des produits de digestion est plus nette; mais le sulfate de baryum a l'inconvénient d'adsorber certains polypeptides.

3. Hydrolyse pepsique en milieu phosphorique M/10, ajustement de la solution à un certain  $\text{pH}$  et une certaine concentration en phosphates; électrophorèse avec tampon phosphatique de même  $\text{pH}$  et de même conductivité; à  $\text{pH}$  5.9, on peut séparer 9 fractions correspondant à des polypeptides: 4 composants "basiques" ( $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{B}_3$ , et  $\text{B}_4$ ) 4 composants "acides" ( $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_2$ ,  $\text{A}_3$  et  $\text{A}_4$ ), 1 ensemble de composants "neutres" (N).

Ce fractionnement électrophorétique est probablement dû à la présence, dans les chaînes polypeptidiques libérées au cours de l'hydrolyse pepsique, d'radicaux amino-acides ayant des charges électriques différentes; il s'oppose à la similitude de certaines propriétés physico-chimiques de ces polypeptides.

### SUMMARY

The electrophoretic fractionation of the split products resulting from the hydrolysis of proteins by pepsin was carried out in three different ways:

1. Peptic hydrolysis in acetic acid N/2 or N/1, chlorhydric acid or sulphuric acid N/40, N/50; electrophoresis in the same solutions without buffer; the hydrolysis products move more slowly than the original protein; the separation of the different polypeptides is difficult.

2. Peptic hydrolysis in sulphuric acid N/10, elimination of  $\text{SO}_4\text{H}_2$  by  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  and adjustment of the solution to the same conductivity as the buffered solution used for the electrophoresis: it is possible to operate in a larger range of  $\text{pH}$  and the separation of the hydrolysis products is clearer; but  $\text{SO}_4\text{Ba}$  adsorb a rather important fraction of the polypeptides.

3. Peptic hydrolysis in phosphoric acid M/10, adjustment of the solution to a certain  $\text{pH}$  and a certain phosphate concentration; electrophoresis with a phosphate buffer of the same  $\text{pH}$  and conductivity: at  $\text{pH}$  5.9 nine fractions can be identified, which correspond to polypeptides: 4 "basic" components ( $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{B}_3$ ,  $\text{B}_4$ ), 4 "acid" components ( $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_2$ ,  $\text{A}_3$ ,  $\text{A}_4$ ), a group of "neutral" components (N).

This electrophoretic fractionation depends probably from the presence, in the polypeptide chains set free during the peptic digestion, of amino-acids bearing different electrical charges; this differentiation is opposed to the similarity of several physico-chemical properties of this polypeptides.

### ZUSAMMENFASSUNG

Die elektrophoretische Trennung der Pepsinhydrolyseprodukte von Eiweisskörpern ist auf 3 Arbeitsweisen ausgeführt worden:

1. Pepsinhydrolyse in N/1 oder N/2 Essigsäure, N/40, N/50 Salzsäure oder Schwefelsäure; anschliessend Elektrophorese in denselben ungepufferten Media: die Hydrolysenprodukte bewegen sich langsamer als das intakte Eiweiss; die Trennung der verschiedenen Polypeptidbestandteile ist schwierig.

2. Pepsinhydrolyse in N/10 Schwefelsäure, quantitative Entfernung von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit Baryt und Justierung der Lösung auf gleiche Leitfähigkeit wie der bei der Elektrophorese benutzte Puffer: die untersuchte  $\text{pH}$ -Zone ist grösser und die Trennung der Hydrolysenprodukte besser: das Bariumsulfat hat aber die unangenehme Eigenschaft, gewisse Polypeptide zu adsorbieren.

3. Pepsinhydrolyse in M/10 Phosphorsäure, Justierung der Lösung auf einen bestimmten  $\text{pH}$  und eine bestimmte Phosphatkonzentration; Elektrophorese mit Phosphatpuffer von gleichem  $\text{pH}$  und Leitvermögen: bei  $\text{pH}$  5.9 kann man 9 Fraktionen, die Polypeptiden entsprechen, trennen: 4 "basische" Komponenten ( $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{B}_3$  und  $\text{B}_4$ ), 4 "saure" Komponenten ( $\text{A}_1$ ,  $\text{A}_2$ ,  $\text{A}_3$  und  $\text{A}_4$ ), und ein Gemisch "neutraler" Komponenten (N).



Diese elektrophoretische Fraktionierung beruht wahrscheinlich auf der Anwesenheit von Aminosäureradikalen mit verschiedener elektrischer Ladung in den durch die Pepsinhydrolyse freigesetzten Polypeptidketten: sie steht im Gegensatz zu der Ähnlichkeit gewisser physikalisch-chemischer Eigenschaften bei diesen Polypeptiden.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> A. TISELIUS ET I. B. ERIKSSON-QUENSEL, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1752.
- <sup>2</sup> P. BOULANGER ET G. BISERTE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 28 (1946) 481.
- <sup>3</sup> *Symposium sur les protéines*: p. 13 (Collection Médecine et Biologie, no. 5, Masson et Cie, édit., Paris 1946).
- <sup>4</sup> L. G. LONGSWORTH, *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (1940) 2530.
- <sup>5</sup> J. S. L. PHILPOT, *Biochem. J.*, 29 (1935) 2458.

Reçu le 20 Avril 1948