

The biological activity of insulin derivatives

The increase in the glucose uptake of rat diaphragm caused by small quantities of insulin^{1,2} provides a method of determining whether any fraction of its original activity is retained in purified fragments or derivatives of insulin.

Fractions A and B of insulin were prepared by the original method of SANGER³. In some cases, further purification was attempted by electrophoresis in 20% (v/v) formic acid at 220 V for 10 h. Insulin treated in the same way showed no alteration in biological activity.

At levels of 0.5 μ g, Fractions A and B showed no activity. Some activity was found with 25 μ g, but this was less than that shown by 1/100th the amount of insulin (Table I). The effect of a combination of Fractions A and B was additive and not synergistic. This activity of the two peptides may be due to associated insulin, although this is less likely with Fraction A which moves in the opposite direction in the electrophoresis.

Esterified insulin was prepared by suspending 100 mg recrystallised insulin in 10 ml methanol and adding 10 ml 0.1 N HCl (in methanol). The suspension was shaken for 24 h at 25°. A large volume of dry ether was added rapidly, and the esterified

TABLE I
THE EFFECT OF FRACTIONS A & B (SANGER) OF INSULIN ON GLUCOSE UPTAKE OF
THE ISOLATED RAT DIAPHRAGM
mg glucose/g diaphragm/h.

Expt. No.	1	2	3	4	5
	Control	Fraction A (25 μ g)	Fraction B (25 μ g)	Fractions A (25 μ g) and B (25 μ g)	Insulin (0.25 μ g)
No. of hemidiaphragms	4	6	6	6	6
Mean	1.30	2.97	2.58	4.18	4.02
$\pm$ S.E. of mean.	± 0.21	± 0.17	± 0.17	± 0.17	± 0.17
Fisher's P		1 v 2 P < 1%	1 v 3 P < 1%	1 v 4 2 v 4 3 v 4 P < 1%	

TABLE II
THE EFFECT OF ESTERIFIED INSULIN ALONE AND IN COMBINATION WITH INSULIN
ON GLUCOSE UPTAKE OF THE ISOLATED RAT DIAPHRAGM
mg glucose/g tissue/h.

Expt. No.	1	2	3	4
	Buffer	Esterified insulin (0.25 μ g)	Insulin (0.25 μ g)	Esterified insulin (0.25 μ g) + Insulin (0.25 μ g)
No. of hemidiaphragms	6	8	8	8
Mean	1.33	1.81	3.09	3.18
$\pm$ S.E. of mean	± 0.183	± 0.159	± 0.159	± 0.159
Fisher's P		1 v 2 P > 5%	1 v 3 P < 1% 2 v 3 P < 1%	1 v 4 P < 1% 3 v 4 P > 5%

insulin centrifuged off and washed repeatedly with dry ether. Under these conditions there was complete esterification of all the carboxyl groups¹.

Esterified insulin showed no increased uptake of glucose with the rat diaphragm. This is in agreement with previous work using other biological tests⁴⁻⁷. Furthermore, esterified insulin did not affect the increased uptake caused by insulin (Table II).

I wish to thank Professor F. G. YOUNG, F.R.S. and Dr. F. SANGER, F.R.S. for their interest in this work.

Department of Biochemistry, Cambridge (Great Britain)

D. S. H. W. NICOL*

¹ J. GROEN, C. E. KAMMINGA, A. F. WILLEBRANDS AND J. R. BLICKMAN, *J. Clin. Invest.*, **31** (1952) 97.

² P. J. RANDLE, *J. Endocrinol.*, **13** (1956) 1.

³ F. SANGER, *Biochem. J.*, **44** (1949) 126.

⁴ W. F. MOMMAERTS AND H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, **185** (1950) 909.

⁵ F. H. CARR, K. CULHANE, A. T. FULLER AND S. W. F. UNDERHILL, *Biochem. J.*, **23** (1929) 1010.

⁶ K. FREUDENBERG, W. DIRSCHERL, H. EICHEL AND E. WEISS, *Hoppe-Seyl. Z.*, **202** (1931) 159.

⁷ M. B. GLENDENNING, D. M. GREENBERG AND H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, **167** (1947) 125.

Received December 1st, 1958

* Beit Memorial Fellow for Medical Research.

Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel: l'électrosynérèse

L'analyse immunochimique dans un gel (A.I.G.)^{1,2} est actuellement la méthode de choix pour le dénombrement et l'identification des mélanges d'antigènes. Mais dès qu'il s'agit d'antigènes de poids moléculaire élevé, la faible diffusion de l'antigène fait que les lignes de précipité sont lentes à apparaître et se forment soit à l'interface antigène-gélose, soit dans la couche d'antigène où elles sont difficilement distinguables les unes des autres. La séparation préalable des différents antigènes par électrophorèse de zone, telle qu'elle a été utilisée par POULIK³, par GRABAR ET WILLIAMS⁴ et par SLATER⁵ est suivie, dans ces techniques, d'une diffusion double, avec les inconvénients signalés plus haut.

J'ai donc cherché à provoquer la précipitation immunochimique *au cours de la migration* convergente de l'antigène et de l'anticorps dans une plaque de gélose soumise à un champ électrique. En effet, la plupart des anticorps ayant une mobilité électrophorétique (à pH ≤ 9) inférieure à la vitesse du flot électroosmotique dans les mêmes conditions, les anticorps se déplacent vers la cathode alors que tous les antigènes ayant des mobilités absolues de -2.10^{-5} à -6.10^{-5} V⁻¹cm² se déplaceront vers l'anode.

Si l'on dispose la solution gélosée d'anticorps vers l'anode et celle d'antigène vers la cathode, dans des cavités pratiquées dans une plaque de gélose (en utilisant un dispositif déjà décrit⁶), qu'on soumet à un champ de l'ordre de 5 V/cm, on obtient la rencontre des réactifs et leur précipitation locale après un temps court.

Les Figs. 1 et 2 sont des photographies prises après 30 (Fig. 1) et 75 min (Fig. 2) d'une électrosynérèse (E.S.) comportant de la sérum albumine humaine purifiée (1 mg/ml) dans la cavité cathodique et l'immunsérum homologue de lapin dans la