

tion: 30 minutes for experiment No. 1, 40 minutes for experiment No. 2 and 3.)

Colorimetric reading	Experiment		
	1	2	3
1. For control, without ribonuclease and penicillin .	0.55	0.51	0.50
2. For control, with ribonuclease, but without penicillin	0.20	0.10	0.02
3. Ribonuclease with penicillin $1 \cdot 10^{-3}$	0.35	0.35	0.25
4. Ribonuclease with penicillin $1 \cdot 10^{-4}$	0.30	0.24	0.10
5. Ribonuclease with penicillin $1 \cdot 10^{-5}$	0.25	0.17	0.06
6. Ribonuclease with penicillin $1 \cdot 10^{-6}$	0.20	0.10	0.02

From these results, it appears that concentrations of $1 \cdot 10^{-3}$ and $1 \cdot 10^{-4}$ produce a strong inhibition and that concentrations of $1 \cdot 10^{-5}$ are slightly inhibitory in the conditions of our experiments.

Although it is not our intention to explain the antibiotic activity of penicillin by the sole fact that it inhibits ribonuclease, it is to be recalled here that KRAMPITZ and WERKMAN¹ found that penicillin interferes with the dissimilation of cellular ribonucleic acid and of sodium ribonucleate as a substrate for *Staphylococcus aureus* and other bacteria.

It is however worthy of note that two of the most active antibiotics (penicillin and streptomycin) inhibit the same enzyme. The mechanism of the inhibition is however not the same: streptomycin acts on the substrate, penicillin on the enzyme itself. Concerning this last fact we have proved by methods previously described² that penicillin and acridines (and of course streptomycin) do not compete for ribonucleoproteids. The difference in chemical structure offers an easy explanation of the results.

This research was aided by a grant of the Vander Stricht Foundation and of the Ella Sachs Plotz Foundation.

L. MASSART, G. PEETERS, and A. VANHOUCKE

Biochemical Laboratory (Biochemical Centrum) and Pharmacological Laboratory (Veterinary College), University of Ghent, August 22, 1947.

Résumé

L'activité de la ribonucléase vis-à-vis des ribonucléoprotéides de la levure est inhibée par la pénicilline.

¹ L. O. KRAMPITZ and C. H. WERKMAN, Arch. Biochem. 12, 57 (1947).

² L. MASSART, G. PEETERS, and A. VANHOUCKE, Exper. 3, 289 (1947).

Neuere Beiträge zur Technik
der Fraktionierung der Serumeiweißkörper

Die neueren, so erfolgreichen Verfahren der Fraktionierung der Eiweißkörper des Blutserums mit Hilfe der Elektrophorese¹, bzw. der abgestuften Ausfällung durch

verdünnten Alkohol¹, haben die ältere Methode der Elektrodialyse² etwas in den Hintergrund gedrängt. Eine Proteinfractionierung kann in letzterem Falle zum mindesten bis zu einem gewissen Grade durch eine fortlaufende Entsalzung des Serums im Zusammenhang mit einer vorsichtigen Verringerung des p_H , durchgeführt werden. Ein derartiger Eingriff kann nur dann als schonend angesehen werden, wenn der Prozeß der Reinigung wenig Zeit in Anspruch nimmt, unphysiologische Temperatursteigerungen ausgeschlossen bleiben, eine hinreichende Sterilität gesichert ist und erhebliche Verschiebungen des p_H ³ vermieden werden können. Gerade der Verwirklichung der letzten Fundamentalbedingung stellten sich bisher nahezu unüberwindliche Schwierigkeiten entgegen.

In all denjenigen Fällen, wo man natives, d. h. unverdünntes Serum fraktionieren muß und der Zusatz blutfremder Substanzen unerwünscht ist, ist die Elektrodialyse daher allein das gegebene Verfahren. Man zögerte aber mit ihrer Anwendung wegen des obengenannten Mangels.

Schon früher hatte man erkannt, daß die Reaktion des Serums in der Mittelzelle einer Elektrodialyseapparatur weitgehend von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der anodischen Membran abhängt⁴. Einige Vorstudien hatten gezeigt, daß durch stark positiv aufgeladene Diaphragmen gefährliche Ionenstauungen bzw. zu tief gehende Reaktionsverschiebungen⁵ vermieden werden konnten. In diesem Zusammenhang bediente man sich u. a. auch mit Proteinkörpern imprägnierter Kollodiummembranen⁶.

Aus verschiedenen, vornehmlich versuchstechnischen Gründen kann man die bisher auf diesem Gebiete vorliegenden spärlichen Untersuchungen bestenfalls als vorläufige bezeichnen.

Die bisher empfohlenen zwei Verfahren zur Membranherstellung⁷ wurden eingehend geprüft und neue Wege zu ihrer Vervollkommnung eingeschlagen. Bei diesen Verfahren wird entweder flüssiges Kollodium mit pulverförmigen Trockenpräparaten aus verschiedenen Serumeiweißkörpern geschüttelt und aus derartigen Suspensionen durch Ausgießen Membranen hergestellt. Im anderen Falle wird das Eiweiß direkt auf die Oberfläche des Diaphragmas gebracht.

Auf bekannte Weise stellten wir aus Rinder Serum, vorerst durch reine Elektrodialyse bzw. durch eine Kombination mit Aussalzverfahren durch Ammoniumsulfat, die drei Eiweißfraktionen her, die man mit Pseudoglobulin, Euglobulin bzw. mit Albumin, zu bezeichnen pflegt. Aus den Lösungen, bzw. den salzfreien Niederschlägen, wurden durch Vakuumbehandlung bei niedriger Temperatur und Aussieben Trockenpulver hergestellt. Gearbeitet wurde mit einer schwächeren 2%igen bzw. mit einer 5%igen Kollodiumschwächen, bei variierter Dicke der Diaphragmen. Darüber hinaus wurden auch Pulverpräparate aus unverändertem, genuinem Blutserum verwandt. Mit derartigen Membranen elek-

¹ E. J. COHN und Mitarbeiter, J. Am. chem. Soc. 68, 459 (1946).

² W. O. PAULI, Helv. chim. Acta 25, 137 (1942). – J. DHÉRE, ebenda 27, 1079 (1944).

³ K. O. PEDERSEN, Ultra-centrifugal Studies on Serum and Serum Fractions, Upsala 1945, p. 140.

⁴ H. FREUNDLICH und F. LOEB, Biochem. Z. 150, 522 (1924).

⁵ W. BECK, Biochem. Z. 156, 471 (1925); derselbe, erscheint demnächst in: Ned. Tijdschr. v. Geneeskunde. — G. ETTISCH und W. BECK, Biochem. Z. 171, 443; 172, 1 (1926); dieselben, in: Dtsch. med. Wschr. Nr. 47 (1925). Patente der Elektro-Osmose AG., Berlin.

⁶ D. G. HITCHCOCK, J. gen. Physiol. 8, 61 (1928).

⁷ G. ETTISCH und W. EWIG, Biochem. Z. 216, 401 (1929).

¹ A. TISELIUS, Biochem. J. 31, 1464 (1937).

trodialysierten wir steriles, natives und durchaus hämolysefreies Rinderserum und verfolgten die Veränderung des Wasserstoffexponenten in Abhängigkeit von der Zeit elektrometrisch. Es gelingt in der Regel, in der Zeit von 3—3½ Stunden 100 cm³ Serum so weitgehend zu entsalzen, als dem Leitvermögen von destilliertem Was-

wie wir durch andere Versuche nachweisen konnten, nicht zu erwarten.

Wirksamer als eine Imprägnation mit Pulverpräparaten erschien eine unmittelbare Aktivierung der Kollodiumoberfläche mit Eiweiß. Neben anderen Verfahren kann man sich hier mit Vorteil der Adsorption bedienen¹. Die Wirksamkeit einer derartigen Oberflächenbehandlung hängt in komplizierter Weise von einer großen Reihe von Faktoren ab, wie der Konzentration des Adsorbens, dem p_H , dem Elektrolytgehalt, der Temperatur, der Porosität der Membran, und schließlich auch davon, ob man in Ruhe bzw. in bewegtem Zustand arbeitet. Zu brauchbaren Diaphragmen kann man nur gelangen, wenn man alle diese Faktoren unter Kontrolle bekommt.

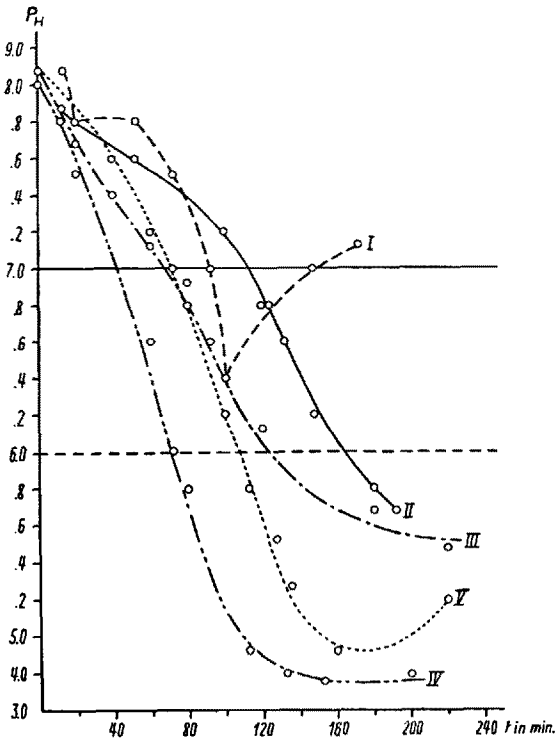


Abb. 1.

ser entspricht. Hierbei wurde ein p_H -Bereich durchschritten, der sich von maximal 8,5 bis minimal 5,2 erstreckte. Die Dicke der Membran bzw. der Gehalt an Eiweißkörpern in den oben angegebenen Konzentrationsgrenzen hatte keinen ersichtlichen Einfluß auf das Ergebnis. Abb. 1 zeigt einige Ergebnisse im Diagramm. Der Neutralpunkt 7,0 ist durch eine ausgezogene, der isoelektrische Punkt des Euglobulins 6,0 durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Schaulinie IV bezieht sich auf einen Versuch mit einer anodischen Pergamentmembran bzw. mit einer Kollodiummembran, die mit Cholesterin präpariert wurde. Die Schaulinie I entspricht einer Kollodiummembran, die Euglobulinpulver enthielt, das ammoniumsulfathaltig war. Die Unstetigkeit in der Kurve wird anscheinend dadurch hervorgerufen, daß im Laufe der Elektrolyse NH_4 -Ionen aus der Membran durch den Mittelraum hindurchwandern, wodurch die Reaktion wieder alkalischer wird. Die Schaulinien II bzw. III nehmen Bezug auf eine Elektrodialyse/Euglobulin-Membran mit einem Gehalt von 2 bzw. 5 % Eiweiß. Der Versuch V bezieht sich schließlich auf ein Diaphragma aus humaner Amnionhaut¹).

Das Diagramm lehrt, daß das Serum im Laufe der Elektrodialyse während beträchtlich langer Zeit eine Reaktion aufweist, die nicht nur unter dem Neutralpunkt liegt, sondern auch den isoelektrischen Punkt des Euglobulins ganz beträchtlich unterschreitet. Eine spezifische Wirksamkeit der Proteine ist nicht zu beobachten und auch infolge der aufgetretenen Denaturierung,

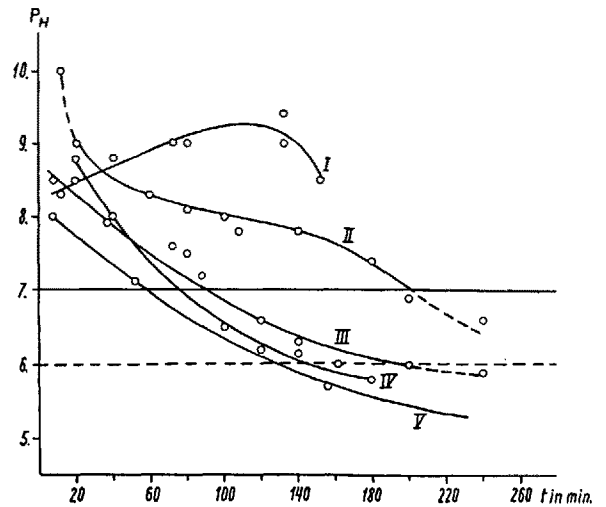


Abb. 2.

Hier sei nur noch erwähnt, daß wir eine Spezifität der Wirksamkeit der verschiedenen Eiweißfraktionen in den Diaphragmen nicht beobachten konnten. Andersartige Feststellungen führen wir in erster Reihe auf eine unzulängliche Berücksichtigung der verschiedenen eben aufgezählten Faktoren zurück. Abb. 2 zeigt das Ergebnis einiger Versuche anschaulich. Die Schaulinie I entspricht zum Beispiel einer Membran, die vorerst, rein qualitativ gesprochen, relativ reich an Protein war. Die Folge davon ist eine Überaktivierung der sehr stark positiven Membran, es kommt überhaupt nicht zu einer Säuerung, sondern im Gegenteil zu einer Alkalisierung während der gesamten Dauer der Elektrodialyse. Die Schaulinie II hat auf ein Diaphragma Bezug, dessen Oberfläche schon geringere Mengen an Protein enthält als I, daher fällt die Reaktion etwas stärker, ohne daß wir hingegen den isoelektrischen Punkt des Euglobulins (6,0) bereits erreichen. Die anderen Kurven III—V zeigen, daß die Steuerwirkung gegen eine Reaktionsverschiebung nach der sauren Richtung hin desto geringer wird, je weniger Eiweiß von der Membran aufgenommen wurde. Die Eigenschaften einer auf derartige Weise abgestimmten Membran lassen es zu, daß wir unverdünntes Serum in sehr kurzer Zeit bei jeder gewünschten Reaktion entsalzen und bis zu einem gewissen Grade fraktionieren können. Abb. 3 zeigt gegenübergestellt die Wirksamkeit einer Pulvermembran II aus unverändertem Vollblutserum bzw. einer Kollodiummembran I, deren Oberfläche das Gesamtprotein aus Nativserum

¹ H. RUNGE und H. SCHMIDT, ebenda 203, 394 (1928).

¹ D. G. HITCHCOCK, J. gen. Physiol. 8, 61 (1928).

enthält. Auf der Abszisse finden wir die spezifische Stromdichte in mA/cm², die auf der Membranoberfläche in der elektrodialytischen Zelle lastet. Bei der gleichen Stromdichte befindet sich das zu elektrodialysierende Serum bei einer sehr viel stärker sauren Reaktion bei der Pulvermembran als bei der anderen. Bei der Adsorptionsmembran I wird der p_H -Abfall in sehr wirksamer Weise gehemmt und verlangsamt, während diese Steuerungwirkung bei der Pulvermembran II sehr viel geringfügiger ist.

Mit Hilfe der oben beschriebenen hochwirksamen Diaphragmen ist es gelungen, Serum auf vorsichtige Weise völlig zu entsalzen, ohne daß hierbei auch nur eine Spur Eiweiß ausfällt. Damit ist die Darstellung von

der Glaselektrode nach dem Abzentrifugieren des Niederschlages gemessen und der Eiweißgehalt der Lösung gravimetrisch bestimmt. Man findet auf diese Weise, daß der isoelektrische Punkt des Euglobulins (um das Ausflocken dieses Eiweißkörpers wird es sich hier vor allem handeln) in der Gegend von p_H 6,0 liegen muß, was mit den Ergebnissen elektrophoretischer Bestimmungen am γ -Globulin in guter Übereinstimmung steht. Es dürfte sich erübrigen, weiter auszuführen, daß das Versetzen eines unveränderten Blutserums mit Säure niemals derartige Ergebnisse liefern kann¹.

Besondere Möglichkeiten bietet ein apparativ und methodisch abgewandeltes Elektrodialyseverfahren für eine weitergehende Unterfraktionierung der Serumproteine.

In diesem Zusammenhang sei auch darauf hingewiesen, daß man kürzlich mit besonderem Erfolg die Elektrodialyse zur Reinigung proteolysierter antitoxischer Heilsera herangezogen hat².

Tabelle II
Elektrophorese von nativem Rinderserum, Phosphatpuffer in physiologischer Kochsalzlösung $p_H = 7,7$
Temperatur = + 3° C

Versuchs- zeit Stunden	Wanderungs- geschwindigkeit cm/min	p_H Serum Versuchs- abschluß	p_H Serum Versuchs- beginn	p_H Un- terschied %	mA
20	12 · 10 ⁻⁴	8,0	8,3	3,6	4,0
20	6,3 · 10 ⁻³	7,6	8,1	6,3	8,0
25	12 · 10 ⁻⁴	7,7	8,1	5,0	4,0
48	12 · 10 ⁻⁴	7,8	8,3	6,0	4,0

Wie schwer es ist, das p_H konstant zu halten, sei schließlich noch durch ein Beispiel aus der Elektrophorese des Blutserums deutlich gemacht. Tab. II gibt Versuche in einem Mikrokataphoreseapparat wieder. Aus diesem konnten Proben des unverdünnten Serums aus dem Anoden- bzw. Kathodenraum mit Hilfe von langen Kapillarpipetten entnommen werden. Die elektrische Anordnung entspricht im Prinzip derjenigen von TISELIUS³. Man sieht, daß schon bei so winzigen Stromstärken wie 4 mA eine deutliche Reaktionsverschiebung nach saurer Richtung hin um etwa eine halbe Zehnerpotenz im Laufe der Zeit auftritt. Hierbei ist es unwesentlich, ob die Probe aus dem Anoden- bzw. dem Kathodenschenkel entnommen wurde.

W. BECK

Kolloidchemisches Laboratorium der Gemeindeuniversität Amsterdam, den 10. Juli 1947.

Ich möchte nicht verfehlen, auch an dieser Stelle dem Direktor des obengenannten Instituts, Prof. Dr. E. H. BUCHNER, für die Förderung dieser Untersuchungen verbindlichst zu danken. Besonders danke ich auch Prof. Dr. CHARLOTTE RUYSS vom Gesundheitsamt der Stadt Amsterdam für das lebhafte Interesse, das sie diesen Arbeiten stets entgegengebracht hat.

Summary

The electrodialytic purification of blood serum was attempted with the aid of specially prepared protein membranes. We succeeded in completely removing the electrolytes from the serum at any desired p_H . The

¹ W. BECK, Biochem. Z. 156, 471 (1925); derselbe, erscheint demnächst in: Ned. Tijdschr. v. Geneeskunde. — G. ERTSCH und W. BECK, Biochem. Z. 171, 443, 172, 1 (1926); dieselben, in: Dtsch. med. Wschr. Nr. 47 (1925). Patente der Elektro-Osmose AG., Berlin.

² W. MODERN und RUFF, Biochem. Z. 311, 188, 196 (1942).

³ A. TISELIUS, Biochem. J. 31, 1464 (1937).

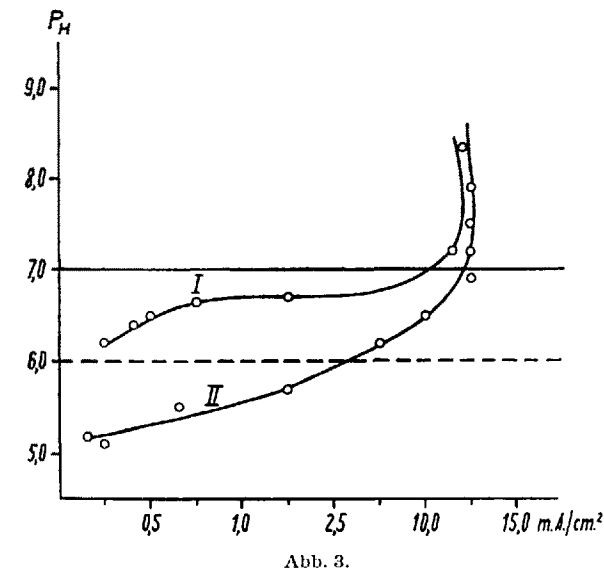


Abb. 3.

völlig elektrolytfreiem Vollserum möglich geworden. Ein derartig hergestelltes Präparat, äußerlich durch nichts von unverändertem Serum zu unterscheiden, bleibt auch bei wochenlangem Aufbewahren im Eisschrank unter sterilen Bedingungen vollkommen unverändert. Diese Erscheinung stellt weiterhin einen sinnfälligen Beweis dafür dar, daß die elektrodialytische Methode einen außerordentlich milden Eingriff darstellt.

Wir wollen an dieser Stelle nur ein kleines Anwendungsbeispiel von den vielen weiteren Untersuchungsmöglichkeiten an derartigen salzfreien Vollseren geben. Es gelingt, durch Versetzen von abgemessenen Proben eines elektrolytfreien Serums dieses mit 0,1n HCl gewissermaßen auf den isoelektrischen Punkt des Elektrodialyse/Euglobulins zu titrieren.

Tabelle I
Titration von salzfreiem Serum $p_H = 8,5$ mit 0,1n HCl

p_H	% Protein in Lösung	% ausgefallenes Protein	Opales- zenz
7,01	7,51	1	+
6,20	7,24	3,58	++
5,93	7,14	5,50	+++
5,40	7,13	5,20	+++
4,50	7,2	4,0	++

Tabelle I gibt eine entsprechende Übersicht. Wie in allen Fällen, wurde auch hier das p_H elektrometrisch mit

blood serum was rendered quantitatively saltfree and any coagulation of proteins was avoided.

Under conditions of sterility these highly concentrated saltfree protein solutions show a remarkable stability.

The colloid-chemical and physiological significance of these results is discussed.

Nouvelle méthode de séparation
des myosines α et β

L'électrophorèse de solutions de myosine préparée selon GREENSTEIN et EDSALL (myosine de WEBER-EDSALL) a révélé l'existence de trois composantes, les myosines α , β et γ de DUBUISSON¹. Elle a montré que la myosine α est turbide et que son pourcentage dépend fortement de l'état de repos ou de fatigue des muscles utilisés¹.

Une méthode de préparation des composantes α et β , par fractionnement au sulfate ammonique, a déjà été mise au point par DUBUISSON² et a été également employée par SZENT-GYÖRGYI³. Les conditions de force ionique et de p_H utilisées pour le fractionnement varient toutefois d'un auteur à l'autre.

Nous avons personnellement observé qu'il est nécessaire d'abaisser le p_H d'une solution de myosine saturée à 27% en sulfate ammonique à 5,4–5,5 pour obtenir une précipitation complète de α ⁴. Ces p_H étant généralement préjudiciables à l'intégrité des protéines, nous avons cherché d'autres méthodes de séparation basées sur les différences de solubilité en fonction du p_H et de la force ionique de ces protéines. Nous avons suivi l'insolubilisation de la myosine α par observation directe de la turbidité de nos solutions après centrifugation.

Si l'on recherche les p_H de précipitation de ces protéines dissoutes dans KCl 0,5 m, on trouve que, dans la zone de p_H 5,55–5,65, α précipite complètement, laissant une solution surnageante limpide, riche en protéines; au dessus de 5,70, on n'observe pas de séparation et en dessous de 5,50, la décantation de α est partielle⁵. On peut donc également scinder ces mélanges à de faibles forces ioniques. Toutefois, la zone de précipitation est trop étroite pour que ce procédé soit applicable au point de vue préparatif. Il présente de plus, en commun avec la méthode au sulfate ammonique, l'inconvénient de réaliser la séparation à des p_H relativement acides. Cette difficulté a pu être tournée dans la nouvelle méthode que nous proposons ci-après, grâce à l'insolubilité de la myosine α dans NaAc ou KAc 0,5 m aux p_H neutres. Le mode opératoire est le suivant:

La solution diluée de myosine dans l'acétate molaire à un p_H d'environ 7,2⁶, est amenée au p_H 7,10 (lorsqu'ils'agit

de solutions pauvres en myosine α , telles que les solutions de myosine de WEBER-EDSALL) ou 7,00 (solutions riches en myosine α : myosine B de SZENT-GYÖRGYI). On ajoute lentement, au moyen d'une burette, un même volume d'eau glacée en agitant mécaniquement la solution. La biréfringence disparaît complètement entre 0,6 et 0,5 m. La solution ainsi obtenue de p_H 7,50–7,60 (myosine de WEBER-EDSALL) ou 7,15–7,30 (myosine B) donne, après centrifugation, une solution surnageante, limpide, riche en β lorsqu'on part de myosine de WEBER-EDSALL. A des p_H moindres, α se sépare plus aisément en entraînant une plus forte proportion de β : la solution limpide de β contient 60 à 70% du mélange, lorsque le p_H final de précipitation est de 7,50–7,60, 40% environ lorsqu'il est de 7,00–6,50.

Un fractionnement meilleur encore peut être obtenu par dialyse de solutions de myosine 0,85 m en acétate et 0,05 m en phosphate de p_H 7,6 contre des solutions de même composition et p_H et de force ionique moindre. Dans ce cas, α ne se sépare complètement par centrifugation que lorsque la force ionique de la solution de dialyse est inférieure à 0,43 (0,3 m en acétate et 0,046 m en phosphate). Nous avons amené la force ionique de nos solutions à 0,40 et déterminé les concentrations en protéines de la solution contenant en suspension la myosine α et de la solution surnageante limpide obtenue après centrifugation. Quelques résultats ont été consignés dans le tableau ci-dessous:

Nature de la myosine	Teneur en protéines %		Teneur en α en %
	avant centrifugation	après centrifugation	
Myosine de WEBER-EDSALL, temps d'extraction: 1 h 30 min no 1	1,56	1,30	17
	1,65	1,45	12
Myosine de WEBER-EDSALL, temps d'extraction: 1 h 30 min no 2	1,13	0,99	12,3
	1,34	1,2	10,4

Ces chiffres ne peuvent être comparés avec la valeur de 25% trouvée par électrophorèse (DUBUISSON¹), étant donné que les muscles utilisés au cours de nos expériences avaient été préalablement plongés dans l'eau glacée, et que DUBUISSON a montré récemment² que dans ce cas on a affaire à des muscles stimulés et, par conséquent, livrant peu de myosine α . Les teneurs peu élevées obtenues montrent néanmoins que la coprécipitation est très faible dans ces conditions malgré les fortes concentrations en protéines auxquelles le fractionnement a lieu. La méthode semble donc susceptible d'être également utilisée pour le dosage de la myosine α dans différents extraits musculaires.

G. HAMOIR

Laboratoire de biologie générale, Faculté des sciences, Université de Liège, le 3 septembre 1947.

¹ M. DUBUISSON, Exper. 2, 258 (1946).
² M. DUBUISSON, Exper. 2, 412 (1946).
³ A. SZENT-GYÖRGYI, Muscular contraction. Acad. Press, N. Y., 1947.
⁴ Sauf indication contraire, il s'agit de myosines préparées selon GREENSTEIN et EDSALL⁷ mais avec un temps d'extraction de vingt minutes seulement.
⁵ L'insolubilisation bien connue de la myosine d'EDSALL dissoute dans KCl 0,5 m, en dessous du p_H 6 (EDSALL⁸) ou 5,8 (DUBUISSON⁹), correspond donc surtout à la précipitation de la composante α .
⁶ La myosine à fractionner peut aussi être dissoute dans une solution 0,85 m en acétate et 0,05 m en phosphate, de façon à éviter les modifications de p_H par dilution.
⁷ J. P. GREENSTEIN et J. T. EDSALL, J. biol. Chem. 123, 397 (1940).
⁸ J. T. EDSALL, J. biol. Chem. 89, 289 (1930).
⁹ M. DUBUISSON, Arch. intern. Physiol. 51, 133 (1941).

¹ M. DUBUISSON, Exper. 2, 258 (1946).
² M. DUBUISSON, Exper. 3, 372 (1947).