

Über die Farbstoffbindung durch mono-
molekulare Proteinschichten

Um die Farbstoffbindung durch monomolekulare Proteinschichten in der Langmuir-Wanne bestimmen zu können, war es notwendig, die Messung in 2 Stufen vorzunehmen. Dazu wurde die benutzte Langmuir-Wanne aus Spiegelglas, mit den Abmessungen $13 \times 49 \times 0,4 \text{ cm}^1$, durch einen eingekitteten Glasstreifen *g* in 2 gleichgroße Räume bzw. Oberflächen geteilt. Dieser Glasstreifen ist gerade so hoch, daß er beim gefüllten Trog eben noch überspült wird; es genügt, ihm einen entsprechend schmal geschnittenen Streifen aus Gummituch aufzulegen, um eine wasserdichte Trennung der beiden Troghälften *A* und *B* zu erreichen. Für den Versuch wird *A* mit 0,85 NaCl angefüllt, das mit Azetat-Puffer (MICHAELIS) von mol/500 auf ein pH von 4,7 gebracht wurde; nach sorgfältiger Reinigung der Oberfläche wird in üblicher Weise mit der «Agl»-Mikropipette 35 γ Protein gespreizt (0,2% Isoamylalkohol zugemischt)². Nun wird *B* (immer bei gesperrtem *g*) mit der ebenfalls gepufferten Farbstofflösung angefüllt und die Oberfläche gereinigt. Nach 10 Minuten wird der Gummistreifen bei *g* vorsichtig abgehoben und mit einem Glasstreifen der Proteinfilm langsam von *A* nach *B* verschoben. Nach 20 Minuten wird der Proteinfilm über *B* zwischen zwei Glasstreifen auf eine Fläche komprimiert (siehe Abb. 2 a),



Abb. 1. In zwei gleiche Hälften unterteilte Langmuir-Wanne *g* eingekitteter Glasstreifen gespreiteter Film die nur 1 cm breit und 13 cm lang (Trogbreite) ist. In diesem schmalen Zwischenraum wird unter stumpfem

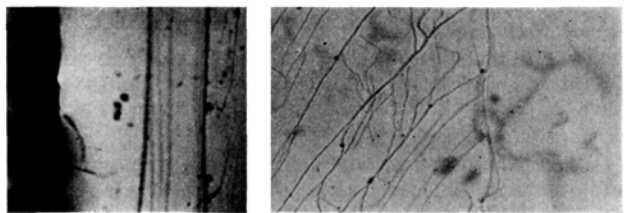


Abb. 2. a Rand des gestauchter Fibrinogenfilm, der mit Evans-Blue gefärbt ist. Vergrößerung: 120fach b Fibrinogenfilm, ungefärbt, auf Glasstreifen deponiert. Vergrößerung: 68fach

Winkel ein Glasstreifen von 1 cm Breite langsam über den Trogrand und unter den komprimierten Film geschoben; allmählich bewegt man den Glasstreifen quer über den Trog, so daß der gefärbte Film quantitativ von der Oberfläche abgehoben und in feinen Fäden auf dem Glasstreifen sichtbar wird (siehe Abb. 2b). Am Glasstreifen noch haftende Flüssigkeit wird mit Filterpapier abgetupft und der kondensierte Film in 3 cm³ 0,1-*n*-NaOH gelöst. Dieses gefärbte Proteinsol verbringt man in die Quarzküvette des Beckman-Spektrophotometers Modell DU; dort wird die Absorption des Proteins auf Wellenlänge 282 m μ und diejenige des Farbstoffes auf der Wellenlänge seiner maximalen Absorption bestimmt. Die Gehalte werden aus Eichkurven entnommen; dabei hat sich als günstig erwiesen, jeweils 4 Proteinfilme von je 30 γ in denselben 3 cm³ 0,1-*n*-NaOH zu lösen und zur Messung zu bringen. Der Berechnung wurde für Albumin ein Teilchengewicht von 69000 und für Fibrinogen ein solches von 400000¹ zugrunde gelegt. Aus der Reihenfolge der Farbstoffbindung geht hervor, daß dafür nicht sosehr die chemische Struktur des Farbstoffes (Zahl der Sulfo-
gruppen usw.) für die Affinität verantwortlich ist als die Dispersion des Farbstoffsoles. So wird das grobdisperse Kongorot am stärksten gebunden, das feindisperse Evans-Blau nur mittelstark und das molekular-disperse Naphtholgelb überhaupt nicht meßbar. Die Farbstoffbindung ist somit in erster Linie kolloidchemisch bedingt. Wird das pH in *B* so verändert, daß eine Dispersionsabnahme des Farbstoffsoles eintritt, so sinkt auch die gebundene Farbstoffmenge, die sich für Evans-Blue bei den pH 7–4,7–2 wie 0,5 zu 1,2 zu 2 verhält. Als Vergleich sei angeführt, daß das ungespreitete Albumin bei pH 7 8–14 Moleküle Evans-Blue bindet (RAWSON²) und bei pH 2 deren 70 (LEVEEN und FISHMAN³).

CH. WUNDERLY

Medizinische Universitätsklinik Zürich, den 18. März 1951.

Summary

An ordinary Langmuir-trough for the spreading of proteins is divided into two equal spheres by a glass barrier (see fig. 1). Protein mono-layers can easily be transferred from the surface where they are spread to the adjacent surface, where the binding of dyestuffs (Evans-blue, Trypan red, Trypan blue, Congo red, Naphthol yellow) takes place. The coloured protein mono-layer is brought into the condensed state (see figure 1a), deposited upon a glass slide (see figure 1b) and dissolved in 3 cm³ of 0.1-*n*-NaOH. Protein as well as dyestuff-

¹ J. L. ONCLEY, *Plasma Proteins* (Springfield, Ill., U.S.A., 1950), p. 8.
² R. A. RAWSON, *Amer. J. Physiol.* 138, 708 (1943).
³ H. LE VEEN und W. H. FISHMAN, *Amer. J. Physiol.* 151, 26 (1947).

¹ CH. WUNDERLY, *Research* 3, 531 (1950).
² A. E. ALEXANDER, *Surface Chemistry* (London, 1949), p. 123.

Farbstoff	Molekular- gewicht	Messung auf Wellen- länge	121,8 γ Albumin binden		1 Molekül Albumin bindet Moleküle Farbstoff	117,6 γ Fibrinogen binden		1 Molekül Fibrinogen bindet Moleküle Farbstoff
			γ	Mole- küle		γ	Mole- küle	
		m μ		$\times 10^{15}$			$\times 10^{15}$	
Evans-Blue, Toluidinfarbstoff .	948	600	2,0	1,3	1,2	3,1	1,9	11
Trypanrot, Benzidinfarbstoff .	980	500	4,2	2,5	2,4	6,0	3,7	21
Trypanblau, Toluidinfarbstoff .	948	590	6,7	4,2	4,0	8,4	5,3	30
Kongorot, Benzidinfarbstoff .	656	490	5,5	5,0	4,7	7,4	6,7	38

content are evaluated in the Beckman spectrophotometer at their respectively maximal absorption. The transfer of the mono-layer makes it impossible that protein which is dissolved in the substrate during the process of spreading, is measured additionally. This constitutes the first appliance for separating the surface for spreading and the surface where reactions of the surface-chemical type take place. From the extent of binding of the different dyestuffs by serum albumin and fibrinogen, it can be deduced that their dispersion is the determining factor, so that it is a colloid-chemical reaction which governs the affinity between protein mono-layer and azodyestuff.

Model Experiments for the Production of Gastric Hydrochloric Acid

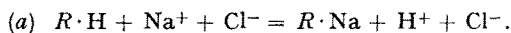
Recent experimental investigations concerning the secretion of hydrochloric acid by gastric mucosa, especially those of DAVIES *et al.*¹, have made important statements with respect to this process. Relations have been established between Q_{O_2} , Q_{CO_2} and Q_{HCl} respectively. The quantitative data of these investigations, however, characterize only the initial and final state and do not interpret the more detailed mechanism of this process.

Undoubtedly, the hydrolysis of the sodium chloride, or the liberation of hydrochloric acid by means of a weaker acid, can only take place at ordinary temperatures by means of substances which have specific affinity for certain ions. These substances must be—to put it perhaps more comprehensibly if not very precisely—permeable for certain ions and not for others. For the reaction concerned we believe that it is possible to find such a model in the ion exchange substances. Ion exchange resins were employed.

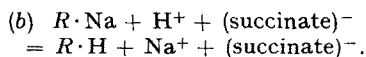
The production of hydrochloric acid from sodium chloride and a weak acid can be written as follows:

¹ R. E. DAVIES, *Biochem. J.* **42**, 609; **43**, 321, 336 (1948).

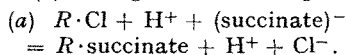
(1) Using cation exchange resin:—



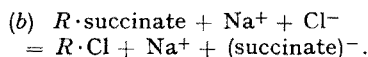
The regeneration of the sodium resin by means of a weak acid, e. g. with succinic acid, proceeds:



(2) Using anion exchange resin:



The resin succinate will be treated:



As the processes (a) and (b) can be carried out separately one after another, we can see that there is a possibility for the production of hydrochloric acid from sodium chloride by means of weak acids.

In our experiments the cation exchange resin was brought into the form $R \cdot H$, the anion exchange resin into $R \cdot Cl$ and washed until of neutral reaction. Then the solution containing the ion to be exchanged was poured into the column. In the case of cation exchange this was a sodium chloride solution; in the case of anion exchange it was succinic acid. The extent of the exchange was measured by titration of the hydrogen ions in the dropping down liquid. Indication was made either with methyl-orange, or by pH-measurements.

Our expectation was fulfilled in both cases. The cation exchange resin, treated with succinic acid, gave with sodium chloride solution hydrochloric acid; on the other hand, the anion exchange resin regenerated by sodium chloride brought a considerable amount of hydrochloric acid into the succinic acid solution.

After these experiments the regeneration of the cation exchange, as well as the treatment of the anion exchange resins by means of a still weaker acid, carbonic acid, was attempted. As the following tables show it was successful:

Table I

Anion exchange Experiments with CO_2

Amberlite IR-4B transferred with HCl into $R \cdot Cl$, washed with distilled water until of neutral reaction:

	(0)	100	ml water saturated with CO_2	pH = 4.20	
$R \cdot Cl$	(I)	10 × 10	ml water saturated with CO_2 until	pH = 3.52	consumed 12.2 ml 0.1 <i>n</i> NaOH
	(II)	5 × 10	ml water saturated with CO_2 until	pH = 3.50	consumed 4.5 ml 0.1 <i>n</i> NaOH
	(III)	5 × 10	ml water saturated with CO_2 until	pH = 3.78	consumed 3.9 ml 0.1 <i>n</i> NaOH

Liberated HCl:

20.6 ml 0.1 *n* NaOH

Table II

Cation exchange

Amberlite IR-105 (commercial form) transferred with 30 × 10 ml water saturated with CO_2 into $R \cdot H$, washed with 5 × 10 ml distilled water until of neutral reaction:

$H \cdot R$	10 ml 2 % NaCl consumed (until 3.60 pH)	1.38 ml 0.1 <i>n</i> NaOH	
	10 ml 2 % NaCl consumed (until 3.60 pH)	1.76 ml 0.1 <i>n</i> NaOH	
	10 ml 2 % NaCl consumed (until 3.60 pH)	0.88 ml 0.1 <i>n</i> NaOH	
	10 ml 2 % NaCl consumed (until 3.60 pH)	0.40 ml 0.1 <i>n</i> NaOH	
	10 ml 2 % NaCl consumed (until 3.60 pH)	0.12 ml 0.1 <i>n</i> NaOH	$R \cdot Na$

Liberated HCl:

4.56 ml 0.1 *n* NaOH