

Fig. 3. Thrombin times of  $\text{BaSO}_4$  adsorbed plasma before  $\square-\square$  and after  $\blacksquare-\blacksquare$  contact activation. Thrombin time of normal intact plasma  $\circ-\circ$ .

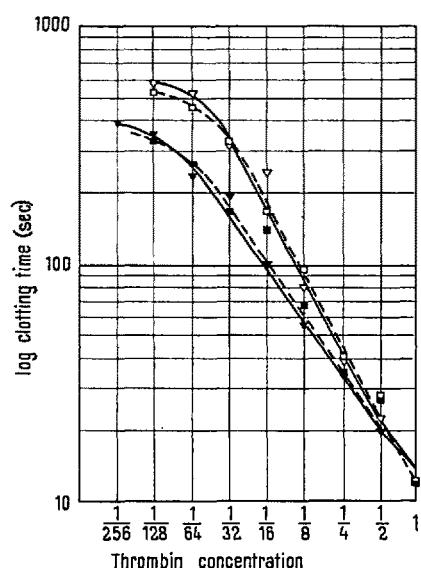


Fig. 4. Thrombin times of haemophilic A plasma before  $\Delta-\Delta$  and after  $\blacktriangle-\blacktriangle$  activation and haemophilic B plasma before  $\square-\square$  and after  $\blacksquare-\blacksquare$  activation.

das Plasma vorher durch Kontakt aktiviert wurde oder nicht. Die Wirkung des Thrombins zeigt sich jedoch deutlicher bei aktiviertem Plasma. Die Thrombinzeit des aktivierte Plasmas ist kürzer als die von inaktivem Plasma.

P. PUDLÁK, IRENA STARÁ, and ERIKA DEIMLOVÁ

Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague (Czechoslovakia), October 24, 1960.

### Versuche zur Isolierung der $\gamma$ -Globuline aus Kaninchenserum durch Acetonfällung<sup>1</sup>

Proteine lassen sich bekanntlich durch Aceton reversibel fällen. Von dieser Möglichkeit zur Gewinnung gereinigter Proteine ist bisher unter anderem Gebrauch gemacht worden bei der Isolierung von Fermenten (COLOWICK und KAPLAN<sup>2</sup>) und bei der Einengung von Liquor (BÜCHER, MATZELT und PETTE<sup>3</sup>). Die Anwendung organischer Lösungsmittel zur Fällung von Proteinen beruht einmal auf einer Herabsetzung der Dielektrizitätskonstanten, zum anderen auf einer Verminderung des an das Protein gebundenen Hydratationswassers. Wie ein Vergleich von Dielektrizitätskonstanten zeigt, wird durch Zugabe von Aceton zu wässrigen Lösungen die Dielektrizitätskonstante einer solchen Lösung stark herabgesetzt (WUHRMANN und WUNDERLY<sup>4</sup>). Außerdem ist Aceton mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar und kann so den Proteinen das Hydratationswasser entziehen. Wegen der Bedeutung der  $\gamma$ -Globuline als Träger der Antikörpereigenschaften versuchten wir zunächst die  $\gamma$ -Globuline von den übrigen Serumproteinen zu trennen, zumal wir zeigen konnten, dass die Antikörpereigenschaften durch Acetonfällung nicht verloren gehen (DREES und MESTER<sup>5</sup>). Über die erhaltenen Ergebnisse soll kurz berichtet werden.

**Methodik.** Für die Fällung wurde Kaninchen-Mischserum verwendet.

Die Chemikalien waren p.a. Substanzen der Firma Merck. Tris wurde von der Firma Sigma, USA, bezogen.

Für die Acetonfällung verdünnten wir 1 Teil Kaninchenserum mit 9 Teilen Tris-Puffer (pH 7,6; Ionenstärke 0,1) (COLOWICK und KAPLAN<sup>2</sup>). Während der Fällung befand

sich die Serumverdünnung in einem Eisbad und wurde magnetisch gerührt. Die Rührgeschwindigkeit war so schnell, dass noch keine Schaumbildung eintrat. Die Zufügung des vorgekühlten Acetons zu der Serumverdünnung erfolgte aus einer eisgekühlten Bürette. Die Zufügungsgeschwindigkeit war so eingestellt, dass einerseits sich in der Serumverdünnung kein Schaum bildete, andererseits die Fällung nach 15 min beendet war. Die Fällung wurde dann auf einer Sole-gekühlten Zentrifuge (Pirouette, Phynwe, Göttingen) 15 min bei 10 000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand von dem Sediment abgegossen und die Zentrifugenbecher mit der Öffnung nach unten auf Fliesspapier gestellt. Die dann noch am Rande der Zentrifugenbecher haftenden Flüssigkeitstropfen wurden mit Fliesspapier entfernt. Das in den Zentrifugenbechern verbleibende Sediment wurde mit dem halben Volumen des eingesetzten Serums mit phosphatgepufferten isotonischer Kochsalzlösung (pH 7,4) im Kühlräum geschüttelt, bis sich das Sediment gelöst hat. Befindet sich noch Albumin in der ausgefällten Fraktion, so ist die Lösung durchsichtig. Die Fraktion, die hingegen die von den übrigen Proteinen befreiten  $\gamma$ -Globuline ent-

<sup>1</sup> Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>2</sup> S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. I, p. 282 und 143.

<sup>3</sup> TH. BÜCHER, D. MATZELT und D. PETTE, *Klin. Wschr.* 30, 325 (1952).

<sup>4</sup> F. WUHRMANN und CH. WUNDERLY, *Die Bluteiweißkörper des Menschen* (Basel 1957), p. 100.

<sup>5</sup> O. DREES und TH. MESTER, in Vorbereitung.

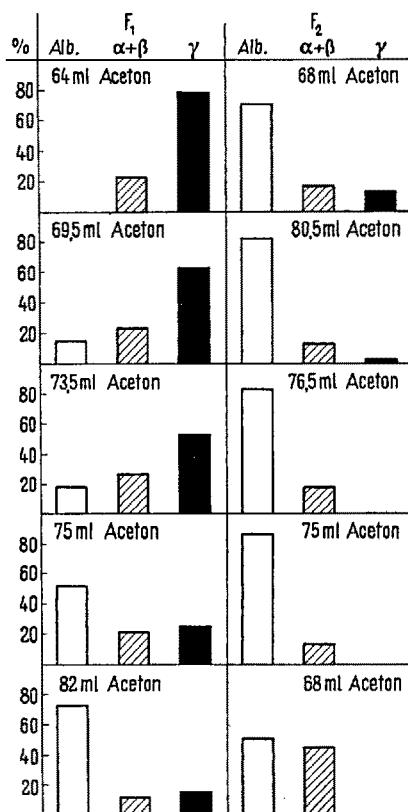


Fig. 1. Elektrophoretische Zusammensetzung (rel. Konz.) der Fraktionen  $F_1$  und  $F_2$  aus Kaninchen-Serum.

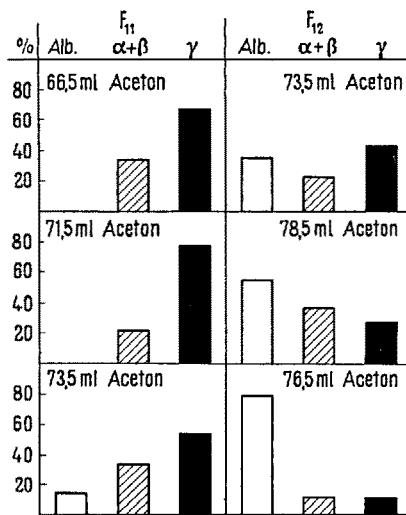


Fig. 2. Elektrophoretische Zusammensetzung (rel. Konz.) der Fraktionen  $F_{11}$  und  $F_{12}$  aus Kaninchen-Serum.

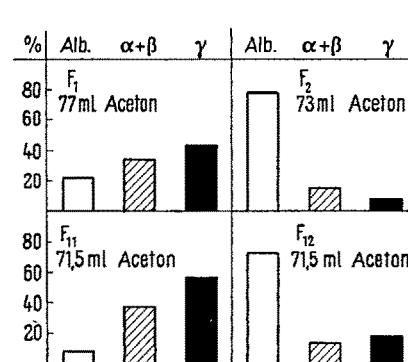


Fig. 3. Elektrophoretische Zusammensetzung (rel. Konz.) der Fraktionen  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_{11}$  und  $F_{12}$  aus Affen-Serum.

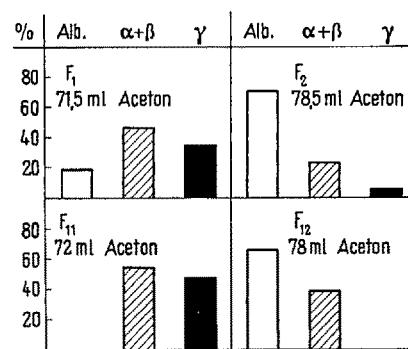


Fig. 4. Elektrophoretische Zusammensetzung (rel. Konz.) der Fraktionen  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_{11}$  und  $F_{12}$  aus Meerschweinchen-Serum.

hält, zeigt eine mehr oder weniger starke weissliche Opaleszenz.

Während dieser Arbeitsgänge ist streng darauf zu achten, dass keine Erwärmung über + 2 bis + 3°C eintritt, da es sonst zu einer teilweise irreversiblen Denaturierung der Proteine kommt. Eine solche Denaturierung macht sich später während der Elektrophorese dadurch bemerkbar, dass Protein teilweise an der Auftragstelle liegen bleibt.

Die durch Acetonfällung erhaltenen Fraktionen wurden dann in der Papierelektrophorese (Protophor, Dargatz, Hamburg) auf ihre Zusammensetzung untersucht. Für die Elektrophorese wurde Veronal-Puffer (Na-Veronal, Na-Acetat; pH 8,6; Ionenstärke 0,1) benutzt (WUNDERLY<sup>6</sup>) und Whatman-Papier Nr. 1. Die Laufzeit betrug 16 h und der Spannungsabfall 75 V. Das Trocknen, Färben (Amidoschwarz 10 B) und Differenzieren der Pherogramme erfolgte ebenfalls nach WUNDERLY<sup>6</sup>. Die Pherogramme wurden nach TURBA und ENENKEL<sup>7</sup> ausgewertet (Photometer Eppendorf, 546 nm, 10 mm Küvette).

**Ergebnisse.** Die Isolierung der  $\gamma$ -Globuline erfolgte durch fraktionierte Acetonfällung. Es wurden 100 ml Serumverdünnung hergestellt (siehe Methodik!) und aus dieser durch Zugabe von 73,5 ml Aceton eine Fraktion  $F_1$  erhalten. Nach dem Abzentrifugieren dieser Fällung wurde aus dem Überstand durch Zugabe von weiterem Aceton die Fraktion  $F_2$  ausgefällt. Die Fällung von  $F_2$  erfolgte durch Zugabe von so viel Aceton, dass 150 ml Aceton/100 ml Serumverdünnung erreicht wurden, in diesem Falle also 76,5 ml Aceton. Durch Variierung der für die Fällung der Fraktion  $F_1$  notwendigen Acetonmenge wurde die Acetonmenge ermittelt, bei der alle  $\gamma$ -Globuline, aber möglichst wenig Albumin sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline ausfielen.

Wie die Figur 1 zeigt, wurde durch Fällung mit 73,5 ml Aceton eine Fraktion  $F_1$  erhalten, die alle  $\gamma$ -Globuline, aber nur wenig Albumin bzw.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline enthielt. Die aus dem Überstand anfallende Fraktion  $F_2$  enthielt den grössten Teil Albumin sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline. Wurde jedoch die Fraktion  $F_1$  mit mehr Aceton (75 oder 82 ml) durchgeführt, so gelangten dadurch auch mehr Albumin sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline in die Fraktion  $F_1$ . Wenn dagegen die Fraktion  $F_1$  mit weniger Aceton (69,5 oder 64 ml) ausgefällt wurde, gelangten nicht alle  $\gamma$ -Globuline in die Fraktion  $F_1$ , sondern ein Teil fiel erst in der Fraktion  $F_2$  aus.

Um aus der Fraktion  $F_1$  möglichst auch noch den Rest Albumin sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline zu entfernen, wurde die Fraktion  $F_1$  nochmals in Tris-Puffer gelöst und einer zweiten Fraktionierung unterworfen.

Die Ergebnisse dieser zweiten Fraktionierung zeigt die Figur 2. Bei der Ermittlung der optimalen Bedingungen für die zweite Fraktionierung gingen wir genau so vor wie bei der Gewinnung der Fraktionen  $F_1$  und  $F_2$ .

Aus der Fraktion  $F_1$  erhielten wir durch Fällung mit 71,5 ml Aceton eine Fraktion  $F_{11}$ , die den grössten Teil der  $\gamma$ -Globuline, aber nur noch wenig  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline enthielt. Albumin konnte mit unseren Methoden nicht nachgewiesen werden. Die aus dem Überstand durch Fällung mit 78,5 ml Aceton erhaltene Fraktion  $F_{12}$  enthielt das Albumin, Teile der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline und noch etwas  $\gamma$ -Globulin. Wurde  $F_{11}$  mit weniger Aceton gefällt, dann erhöhte sich der Anteil des  $\gamma$ -Globulins in der Fraktion

<sup>6</sup> CH. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese* (Aarau 1954), p. 36.

<sup>7</sup> F. TURBA und H. J. ENENKEL, *Naturwissenschaften* 37, 93 (1950).

$F_{12}$ . Bei Fällung von  $F_{11}$  mit mehr Aceton (73,5 ml) verringerte sich wohl das  $\gamma$ -Globulin in der Fraktion  $F_{12}$ , dafür fand sich aber Albumin in der Fraktion  $F_{11}$ , und auch der Anteil der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globuline war erhöht.

In den Figuren 3 und 4 sind die durch fraktionierte Acetonfällung erhaltenen Fraktionen  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_{11}$  und  $F_{12}$  aus Affen(*Macacus rhesus*)- und Meerschweinchenserum dargestellt. Nur durch Änderung der für die Fällung der Fraktionen  $F_1$  und  $F_{11}$  notwendigen Acetomenge gelang es in diesen beiden Fällen nicht, eine weitgehend gereinigte  $\gamma$ -Globulinfraktion zu erhalten.

Unter konstanten Bedingungen (pH, Ionenstärke und Ionenmilieu) gelang es, aus Kaninchenserum, hingegen nicht aus Affen- und Meerschweinchenserum, ein weit-

gehend gereinigtes  $\gamma$ -Globulin zu erhalten. Eine weitere Reinigung der  $\gamma$ -Globuline durch Änderung von pH, Ionenstärke und Ionenmilieu ist in Vorbereitung.

**Summary.** It is possible — under constant conditions, such as pH, ionic strength and ionic milieu — to purify  $\gamma$ -globulins from rabbit-serum, using the fractionated acetone precipitation.

TH. MESTER<sup>8</sup>

*Stiftung zur Erforschung der spinalen Kinderlähmung und der Multiplen Sklerose, Hamburg-Eppendorf, 16. Dezember 1960.*

<sup>8</sup> Mit technischer Assistenz von Fräulein CHRISTEL BORNA.

### Pinguinain: Comparison of Cuban, Puerto Rican and the Thermal Properties

**Introduction.** The existence of two varieties of *Bromelia pinguin* fruit was observed by ASENJO and FERNANDEZ<sup>1</sup>. A long, thin fruit that gives a poor yield of juice is found in sandy soils near the seashore, and a smaller, round, thick fruit that yields large quantities of juice, grows in the interior at higher elevations. These variety differences have been noted in our laboratories in shipments received from Cuba and Puerto Rico. The fruit received from Cuba was long and thin and that from Puerto Rico was of the round, thick variety. ASENJO and FERNANDEZ<sup>1</sup> chose the latter fruit for their work; whereas, we performed our previous studies<sup>2,3</sup> as well as the present thermal studies on the Cuban variety.

In order to determine whether the proteins responsible for the enzymatic activity of these fruits were similar, electrophoretic study with the subsequent construction of electrophoretic titration curves for the components was employed.

**Experimental.** Electrophoretic Comparison: Samples of crude preparations<sup>3</sup> as well as purified fractions<sup>3</sup> from both the Cuban and Puerto Rican varieties were subjected to analytical electrophoresis in a Perkin-Elmer Model 38A apparatus. A variety of ionic strengths from 0.05 to 0.15 and of pH conditions from 3.5 to 6.6 were used with various preparations to determine the number of components and the mobilities of these components in both the Cuban and the Puerto Rican fruit.

Buffers of 0.1 ionic strength were used in the determination of mobilities for the electrophoretic titration curves. The buffers employed below pH 4.0 were glycine HCl-NaCl. From pH 4.5 through 5.35 the buffers were acetate. Between pH 5.5 and 5.85, both acetate and phosphate NaCl buffers were utilized while above pH 5.85 only phosphate NaCl buffers were used.

Thermal Studies: The proteolytic activities of the crude Cuban pinguinain were determined by a modification<sup>3</sup> of the BIDWELL<sup>4</sup> and OAKLEY<sup>5</sup> azocoll procedure.

To determine the thermal inactivation of pinguinain, 1 ml aliquots of enzyme in acetate, pH 5.2, buffer were incubated in a water bath at the given temperatures for 10 min. The solutions were immediately diluted to 10 ml with ice cold acetate buffer containing enough cysteine to give a final concentration of 0.05 M. The protease activity was then determined at 37°C.

The effect of temperature upon the reaction rate was determined in acetate buffer, pH 5.2, containing 0.05 M cysteine. In this study the enzyme was incubated for 20 min in the presence of the substrate at the given temperatures.

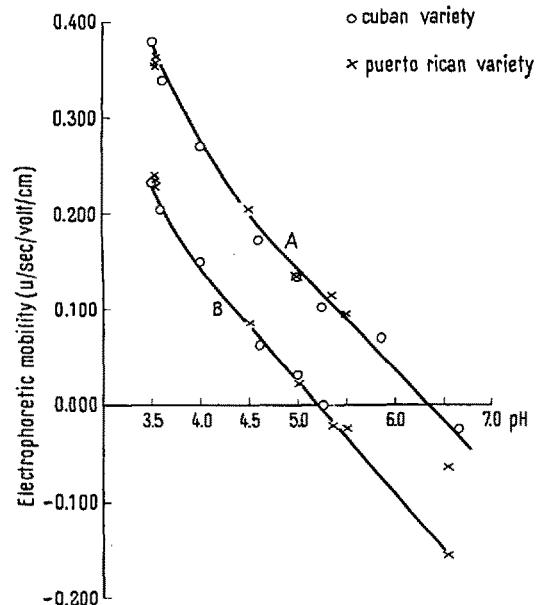


Fig. 1. Electrophoretic titration curve for pinguinain A and B in 0.1 ionic strength buffers

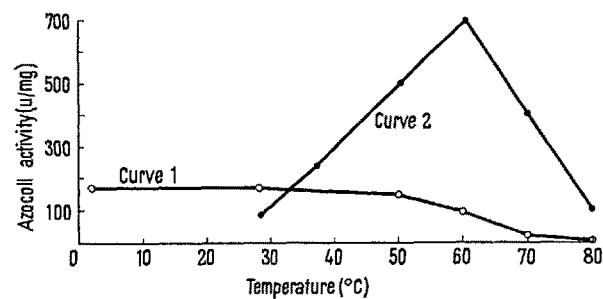


Fig. 2. Effect of temperature on the reaction rate and thermal inactivation of pinguinain solutions

<sup>1</sup> C. F. ASENJO, M. DEL C. FERNANDEZ, J. Agr. Univ. Puerto Rico 29, 35 (1945).

<sup>2</sup> R. A. MESSING, Enzymologia 22, 117 (1960).

<sup>3</sup> R. A. MESSING, A. F. SANTORO, and A. BLOCH, Enzymologia 22, 110 (1960).

<sup>4</sup> E. BIDWELL, Biochem. J. 46, 589 (1950).

<sup>5</sup> C. L. OAKLEY, G. H. WARRACK, and W. E. VON HEYNINGER, J. Path. Bact. 58, 229 (1946).