

NaCl solution containing 0.75% chloroform from a reservoir connected to the column by flexible tubing such that the level of the stock solution was a few centimeters above the top of the gel column. The flow rate was approximately 40 ml per h. In the effluent fractions catalase activity⁴, hemoglobin⁵ and protein by the Folin-Lowry colour⁶ were determined. In some experiments lactate dehydrogenase⁷, aldolase⁸ and pyruvate kinase⁹ activity were measured in addition. Figure 1 demonstrates an elution pattern obtained from 3 ml of hemolysate; Figure 2 shows a pattern obtained from 15 ml of hemolysate on the same column. It is evident that catalase and the other enzymes measured can be separated to a high degree from hemoglobin and other proteins by gel filtration on Sephadex G-100. In our hands, this procedure also proved to be useful in the isolation of catalase active material from blood of 'acatalatic' individuals, as well as in the preparation of hemoglobin solutions virtually free of catalase¹⁰.

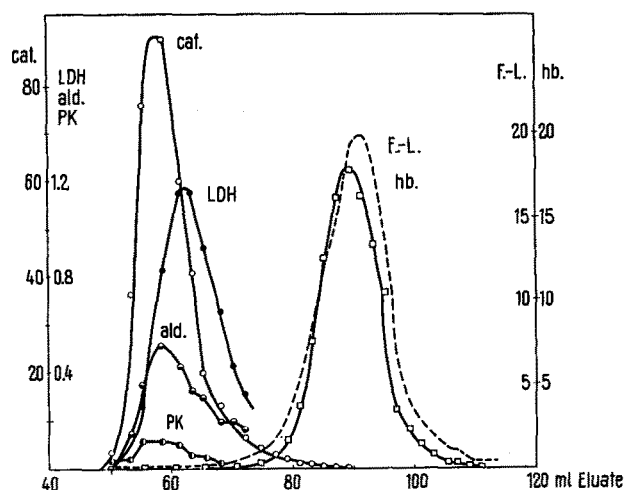


Fig. 1. Gel filtration of 3 ml of hemolysate on Sephadex G-100 (see text); ○—○ catalase (cat.) as milli-equivalents of perborate used in 5 min per ml; ●—● lactate dehydrogenase (LDH) as international enzyme units per ml; ○—○ aldolase (ald.) as international enzyme units per 10 ml; ○—○ pyruvate kinase (PK) as international enzyme units per 10 ml; ○—○ hemoglobin (hb.) as mg per ml; ---- Folin-Lowry colour (F.-L.) as optical density at 750 nm (l = 1 cm) in the eluate.

Automatisches Auftragen von Papierchromatogrammen

Substanzgemische, deren Komponenten sich in ihren Rf-Werten wenig voneinander unterscheiden, lassen sich papierchromatographisch nur dann sauber trennen, wenn es gelingt, den Startfleck klein zu halten. Ist man gezwungen, grössere Lösungsmengen aufzutragen, so kann dieser Arbeitsgang äusserst langwierig sein, insbesondere dann, wenn die zu fraktionierenden Verbindungen keine Erwärmung vertragen. Dies wiederum kann beim Arbeiten mit radioaktiven Präparaten besondere Vorsichtsmassnahmen notwendig machen, die die Vorbereitung der Chromatogramme zusätzlich erschweren.

Wir sind seit einiger Zeit dazu übergegangen, alle Papierchromatogramme automatisch aufzutragen. Dazu bedienen wir uns eines Dauerinfusionsgerätes (Typ «Unita I» der Firma Apparatebau B. Braun, Melsungen,

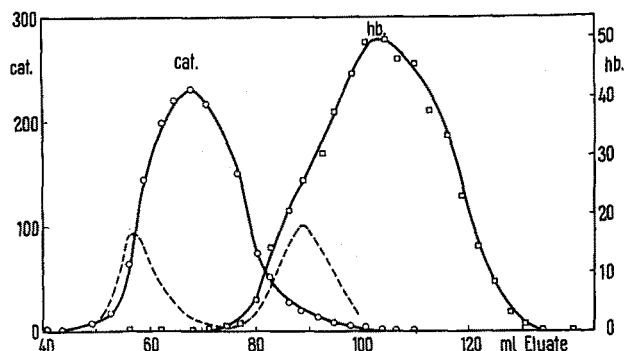


Fig. 2. Gel filtration of 15 ml of hemolysate on Sephadex G-100 (see text) ○—○ catalase (cat.) as milli-equivalents of perborate used in 5 min per ml; hemoglobin (hb.) as mg per ml. Broken lines indicate the catalase and hemoglobin peaks as they were found in the experiment represented in Figure 1. It is to be noted that the positions of the leading edges of the catalase peaks and of the hemoglobin peaks respectively are nearly the same in the two experiments.

Zusammenfassung. Es wird über ein einfaches Verfahren zur Abtrennung von Katalase und anderer Enzyme aus konzentriertem Haemolysat mit Hilfe der Gel-Filtration unter Verwendung von Sephadex G-100 berichtet.

H. AEBI, C. H. SCHNEIDER,
H. GANG, and U. WIESMANN

Medizinisch-chemisches Institut, Universität Bern
(Switzerland), November 5, 1963.

⁴ R. N. FEINSTEIN, J. biol. Chem. 180, 1197 (1949).

⁵ R. K. CANNAN, Clin. Chem. 1, 151 (1955).

⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

⁷ F. KUBOWITZ and P. OTT, Biochem. Z. 314, 94 (1943).

⁸ E. RACKER, J. biol. Chem. 167, 843 (1947).

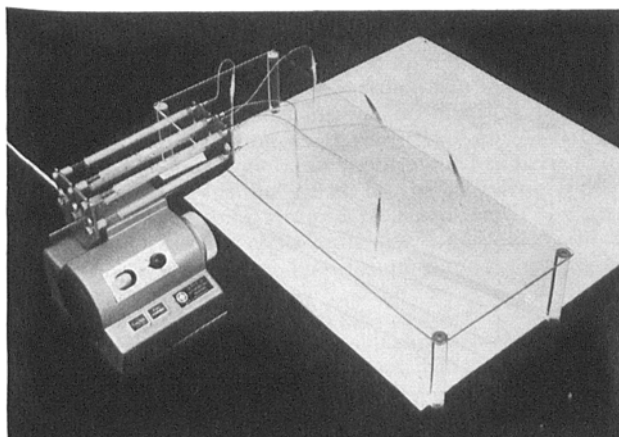
⁹ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOCK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT, and G. PFLEIDERER, Z. Naturforschung 8b, 555 (1953).

¹⁰ **Acknowledgment.** This work was supported by a grant of the 'Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung' (project A142). The authors are also indebted to Miss U. MOSER for technical assistance.

Deutschland), dessen Halterahmen sechs Injektions-spritzen aufzunehmen vermag (vgl. Figur). Bei diesem Apparat lässt sich die Vorschubgeschwindigkeit der Spritzenkolben in 24 Stufen so variieren, dass bei Verwendung von 5 cm³-Pipetten stündlich Mengen zwischen 7,5 mm³ und 30 cm³ abgegeben werden.

Auf den zur Befestigung der Kanülen angesetzten Konus wird jeweils ein PVC-Schlauch aufgeschoben, der die Verbindung zur eigentlichen Auftragepipette, einem zu einer feinen Spitze ausgezogenen Glasröhrchen (Fassungsvermögen etwa 250 mm³) herstellt. Auf diese Weise ist es möglich, durch Wahl verschiedener langer Schläuche sechs waagrecht ausgelegte Papierchromatogramme gleichzeitig zu versorgen. Damit die Chromatographiebögen nicht durch Kapillarkräfte unkontrollierbare Flüssigkeitsmengen aus den Pipetten herausaugen können, erwies es sich als erforderlich, die Spritzen einschliesslich der Verbindungsschläuche und der Kapillaren luft-

blasenfrei mit einer geeigneten Flüssigkeit (s.u.) zu füllen. Dieses Lösungsmittel wird zunächst eingesaugt, und erst dann wird die Glaskanüle so hoch mit der Probe gefüllt, dass nach Abschluss des Auftrags noch einige mm³ in der Kapillare verbleiben. Dadurch wird vermieden, dass austretendes Lösungsmittel eine unerwünschte Vortrennung des Substanzgemisches bewirkt. Die Wahl der geeigneten Füllflüssigkeit wird ebenso wie die Auftrageschwindigkeit von der Art der zu trennenden Substanzen bestimmt. Selbstverständlich sollen die betreffenden Ver-



bindungen in dieser Flüssigkeit praktisch unlöslich sein. Für die Fraktionierung von Dicarbonsäuren, Aminosäuren, Zuckern und Zuckerphosphaten verwenden wir mit gutem Erfolg eine Kohlenwasserstoff-Fraktion («Siedegrenzenbenzin Nr. 4» der Firma Fluka A.G., Buchs, Schweiz). Auf dem Papier 2043 a Mgl der Firma Schleicher & Schüll, Dassel (Deutschland), erhält man hinreichend kleine Startflecke, wenn man von wässrigen Lösungen 20 mm³/h aufträgt. Die Wahl eines organischen Lösungsmittels als Sperrflüssigkeit zwingt jedoch in vielen Fällen zum Auswechseln der zum Dauerinfusionsgerät gehörenden Spritzen mit Metallkonus und Teflondichtung. Da die Kunststoffdichtung durch Benzin verquillt, arbeiten wir mit Spezialspritzen¹, deren Glaskonus unmittelbar auf die Glaswandung aufgeklebt wurde.

Summary. A method for the simultaneous automatic preparation of 6 paper chromatograms is described. The simple apparatus facilitates the handling, especially of temperature sensitive and radioactive solutions.

H. METZNER und HELGA VOLCSIK

Lehrstuhl für chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen (Deutschland), 20. Oktober 1963.

¹ Hersteller: Firma B. Braun, Melsungen, Deutschland.

A Diaphragm Bioassay for the Measurement of Total 'Insulin-Like Activity' and of 'Antigenic Insulin' in Serum

The state of insulin in the blood has been studied by a number of authors and several hypotheses published. Some authors, for example ANTONIADES¹, claim that insulin exists in two forms, that is 'free' and 'bound'. SAMAN and FRASER² and FROESCH³ suggest that there are two forms of 'Insulin-like activity'. BERSON and YALOW⁴ think that there is only one form of insulin.

These discrepancies may, in part, be caused by differences between methods but may be the reflection of a real difference in the behaviour of insulin under the conditions of measurement. The most striking difference is that the values of 'insulin-like activity' detected by *in vitro* bioassay agree neither with the values obtained by other bioassays nor with the values obtained by the radio-immunoassays of YALOW and BERSON⁵ or of HALES and RANDLE⁶.

The assay reported has been designed as a bridge assay to measure insulin which is both biologically and immunologically active. The serum insulin values are in the same order as those obtained by the radio-immunoassay of HALES and RANDLE.

The total 'insulin-like activity' (ILA) of a sample is measured in terms of the effect the sample has on an insulin-sensitive metameter. A value, in insulin units per unit volume, is allocated to the sample by comparison with a curve of metameter against standard insulin. The total ILA of a serum sample is the sum of three components: the activity due to insulin, the insulin-like activity due to substances other than insulin and the anti-insulin effect of insulin inhibitors.

In the assay presented the total ILA is determined in whole serum and a second determination of ILA carried out after incubation with a mixture of insulin antibodies and anti- γ -globulin serum. The ILA measured in this second determination is the residual ILA. The difference between the total and the residual ILA is caused by the binding of insulin to the antibody-anti- γ -globulin complex; the insulin is thus prevented from acting on the diaphragm. The insulin measured by the difference between the two ILA's is the antigenic insulin (AI).

The insulin-sensitive tissue is the isolated mouse quarter diaphragm and the metameter the incorporation of glucose 1-C14 into the glycogen fractions of the diaphragms.

Materials and Methods. Kreb's bicarbonate buffer containing 2.5 mg of glucose and 2.0 mg of gelatine per ml is used throughout the experiments. The buffer is prepared each day and is gassed with 95% oxygen-5% carbon dioxide before use. Mouse diaphragms are prepared according to WARDLOW and MOLONEY⁷ and were used in halves in the early experiments and are used in quarters for

¹ H. N. ANTONIADES, *Endocrinology* **68**, 7 (1961).

² N. SAMAN, N. J. DEMPSTER, R. FRASER, and D. STILLMAN, *Biochem. J.* **82**, 29 P (1962).

³ E. R. FROESCH, H. BURGI, E. D. RAMSEIER, P. BALLY, and A. LABHART, *J. clin. Invest.*, in press.

⁴ S. A. BERSON and R. S. YALOW, *Amer. J. Med.* **31**, 874 (1961).

⁵ R. S. YALOW and S. A. BERSON, *J. clin. Invest.* **39**, 1157 (1961).

⁶ C. N. HALES and P. J. RANDLE, *Biochem. J.* **84**, 798 (1962).

⁷ A. C. WARDLOW and P. J. MOLONEY, *Can. J. Biochem. Phys.* **39**, 695 (1961).