

collagenous sequence appears on the C-end of these peptides (see Table)⁶.

Zusammenfassung. Einige proteolytische Fermente (wie Pronase, Pepsin und Trypsin) beweisen eine beschränkte Wirkung auf das Kollagenmolekül. Die Wirkung dieser Fermente wurde durch die Aminosäuresequenz, die für den Hauptteil des Kollagenmoleküls typisch ist (das

heisst Gly.Pro.X), beschränkt. Dieser Typ der Sequenz wurde als C-Endsequenz im Restkollagen nach der Pronasewirkung bestimmt.

S. BUMP, Z. DEYL⁷ and J. ROSMUS⁸

Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (Massachusetts, USA), 16th February 1967.

⁶ This research was supported by Grant No. NB 00024 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, Department of Health, Education and Welfare, U.S. Public Health Service and by a grant from The Medical Foundation of Boston.

⁷ Present address: Laboratory of Gerontology, Physiological Institute, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague-Krč (Czechoslovakia).

⁸ Present address: Central Research Institute of Food Industry, Prague-Smíchov (Czechoslovakia).

Autoradiographischer Nachweis von Huminsäuren mit ⁵⁹Fe

Für Nachweis und Charakterisierung von Huminsäuren (HS) werden u.a. herangezogen: Alkalilöslichkeit, Absorptionsspektren, Bindung von Schwermetallen¹⁻³; Redoxverhalten^{3,4}; Wanderung im elektrischen Feld⁵⁻⁸; Gehalt an stabilen freien Radikalen^{9,10}; Molekulargewichtsverteilung¹¹⁻¹³ und die nach hydrolytischem, reduktivem oder oxydativem Abbau erhaltenen phenolischen Spaltprodukte¹⁴⁻¹⁶. Mit keiner dieser Methoden allein ist ein spezifischer HS-Nachweis möglich.

Es ist bekannt (Übersicht über die älteren Arbeiten bei¹), dass HS mit einer grossen Anzahl von Metallen reagieren. Für einige der Metall-HS-Verbindungen wurde das Vorliegen von Chelatstrukturen wahrscheinlich gemacht¹⁷⁻²¹.

Bei der Papierelektrophorese wandern chelatgebundene Metallionen mit den HS zur Anode, was durch Zugabe

von ⁵⁹Fe zur HS-Lösung gezeigt werden kann (Figur 1). Bei 100 µg HS/ml lässt sich 1 µg HS durch Markierung mit ⁵⁹Fe autoradiographisch noch nachweisen (Figur 2). In der Autoradiographie verfügt man über einen empfindlichen HS-Nachweis, der in Kombination mit der Papierelektrophorese spezifisch für HS gestaltet werden kann. Störende chelatbildende Nithuminstoffe geben sich im Autoradiogramm durch zusätzliche Schwärzungsbanden zu erkennen. In diesem Fall müssen die Chelatoren vor der Elektrophorese abgetrennt (z.B. durch Gelfiltration an Sephadex) oder mit inaktivem Metall abgesättigt werden.

Methodik. (1) *HS-Präparate:* Die HS werden aus dem Wasser eines HS-reichen Küstenhochmoores mit Blei (II)-nitrat gefällt. Das HS-gebundene Pb²⁺ wird mit

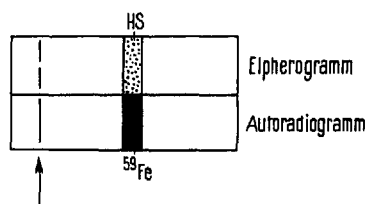


Fig. 1. Nachweis der Bindung von ⁵⁹Fe an HS durch Kombination von Papierelektrophorese und Autoradiographie. Auf die Startlinie (↑) wurden 100 µg Moorwasser-HS + 0,02 µCi ⁵⁹Fe aufgetragen.

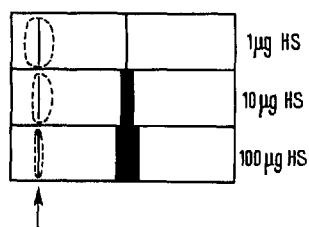


Fig. 2. Autoradiogramme ⁵⁹Fe-markierter HS bei unterschiedlicher HS-Konzentration. Schwärzungsbanden: Position der HS; gestrichelte Linien: Menge des am Start zurückgebliebenen ⁵⁹Fe.

¹ S. ODÉN, Kolloidchem. Beih. 11, H. 3-9 (1919).

² M. M. KONONOVA, *Die Humusstoffe des Bodens* (VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1958).

³ F. SCHEFFER und B. ULRICH, *Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde* (F. Enke-Verlag Stuttgart, 1960), Vol. 1, Teil 3.

⁴ T. BERES und I. KIRALY, *Agrokém. Talajt.* 7, 281 (1958).

⁵ H. BEUTELSACHER, *Z. Pflernähr. Düng. Bodenk.* 57, 57 (1952).

⁶ F. SCHEFFER, W. ZIECHMANN und H. SCHLÖTER, *Z. Pflernähr. Düng. Bodenk.* 70, 260 (1955).

⁷ F. SCHEFFER, W. ZIECHMANN und H. SCHLÖTER, *Z. Pflernähr. Düng. Bodenk.* 85, 32 (1959).

⁸ D. MÜCKE, R. NOACK und R. OBENAU, *Acta biol. med. germ.* 4, 413 (1960).

⁹ C. STEELINK und G. TOLLIN, *Biochim. biophys. Acta* 59, 25 (1962).

¹⁰ H. KLEIST und D. MÜCKE, *Experientia* 22, 136 (1966).

¹¹ N. C. MEHTA, P. DUBACH und H. DEUEL, *Z. Pflernähr. Düng. Bodenk.* 102, 128 (1963).

¹² E. T. GJESSING, *Nature* 208, 1091 (1965).

¹³ R. KLÖCKING, R. HOFMANN und D. MÜCKE, *Z. Lebensmittel-unters. u. -Forsch.* im Druck.

¹⁴ G. GREENE und C. J. STEELINK, *J. org. Chem.* 27, 170 (1962).

¹⁵ T. JAKAB, P. DUBACH, N. C. MEHTA und H. DEUEL, *Z. Pflernähr. Düng. Bodenk.* 102, 8 (1963).

¹⁶ N. A. BURGESS, H. M. HURST und B. WALKDEN, *Geochim. cosmochim. Acta* 28, 1547 (1964).

¹⁷ F. L. HIMES und S. A. BARBER, *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* 21, 368 (1957).

¹⁸ M. M. KONONOVA und N. A. TITOVA, *Bodenk. (UdSSR)* 11, 88 (1961).

¹⁹ H. KLEIST, *Acta biol. med. germ.* 11, 156 (1963).

²⁰ H. KLEIST, *Acta biol. med. germ.* 13, 949 (1964).

²¹ D. MÜCKE und H. KLEIST, *Thaer Arch.* 9, 327 (1965).

Dithizon umgesetzt und das gebildete Bleidithizonat durch Filtrieren und Chloroform-Extraktion entfernt²². Die HS werden mit Eisessig/Diäthyläther als Ammoniumhumate gefällt. Glührückstand (850 °C) < 1%.

(2) *Papierelektrophorese* erfolgt auf Papierstreifen (4 · 30 cm) Filtrak FN 13 (VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag/Erzgebirge) in einem handelsüblichen Gerät (VEB Carl Zeiss Jena). Puffer: Veronal-Azetat nach GRASSMANN und HANNIG²³ (pH 8,6); Ionenstärke 0,1; Laufzeit 3 h, Klemmspannung 200 V, Stromstärke 0,5 mA/cm Streifenbreite.

(3) *Autoradiographie*: 1 ml der HS-Probeflösung wird mit 2 μCi $^{59}\text{FeCl}_3$ (Zentralinstitut für Kernforschung Rossendorf über Dresden) versetzt. 0,01 ml der radioaktiven HS-Lösung wird strichförmig auf der Startlinie

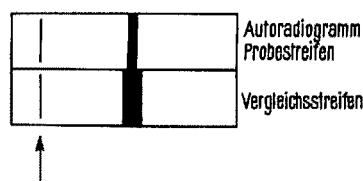


Fig. 3. Autoradiographischer Nachweis von HS. Vergleichsstreifen: 100 μg Moorwasser-HS + 0,02 μCi ^{59}Fe . Probestreifen: 0,01 ml einer 100:1 konzentrierten Trinkwasserprobe.

des Elektrophoresestreifens aufgetragen. Nach beendeter Trennung wird der Streifen luftgetrocknet und anschließend in Kontakt mit ORWO-Röntgenfilm (VEB Filmfabrik ORWO Wolfen) gebracht, Expositionszeit 10 Tage. Als Vergleich dient ein gleich behandelter Elektrophoresestreifen, auf den 0,01 ml einer Lösung von 10 mg HS und 2 μCi $^{59}\text{Fe}/\text{ml}$ aufgetragen werden. Der HS-Nachweis ist positiv, wenn das Autoradiogramm des Probestreifens eine Schwärzungsbande in gleicher Position zeigt wie der Vergleichsstreifen (Figur 3). Zu jedem Nachweis sollten wenigstens 2 Probe- und 2 Vergleichsstreifen ausgewertet werden.

Summary. In paper-electrophoresis metallic ions migrate to the anode together with the humic acids. In combination with autoradiography (using ^{59}Fe) 1 μg of humic acids may be detected.

R. KLÖCKING, H. KLEIST und D. MÜCKE

Institut für Physiologische Chemie der Universität Rostock (DDR), 24. Januar 1967.

²² D. MÜCKE und R. KLÖCKING, *Verfahren zur Gewinnung wasserlöslicher Huminsäuren*, DDR-Patent No. 49 324.

²³ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 290, 1 (1952).

Isolation of a 0.5S γ_2 -Globulin from Normal Human Plasma

Low molecular weight proteins with mobilities of the γ -globulins were detected in plasma several years ago¹ and were found to be concentrated in COHN fraction VI². Recently, we isolated and characterized 2 members of this class of proteins, the 3S γ_1 - and 2S γ_2 -globulins^{3,4}. In the present communication we wish to report on the detection of a 0.5S protein whose electrophoretic mobility corresponds to that of the γ_2 -globulins.

Pooled normal human plasma was fractionated according to COHN method 6⁵. The proteins present in the final supernatant solution, designated as COHN fraction VI, were concentrated by precipitation and then resolved on a DEAE-cellulose column at pH 5.5 yielding 2 gross fractions. One of these fractions contained the mentioned 3S γ_1 - and 2S γ_2 -globulins and certain basic constituents^{3,4}. The other fraction contained the remaining proteins which were eluted subsequently and, after concentration, were further fractionated by chromatography on a DEAE-cellulose column at pH 5.4.

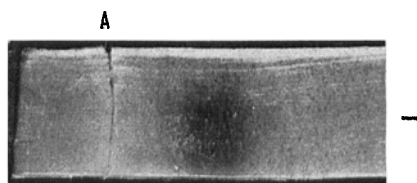
The protein subfraction present in the resulting effluent appeared homogeneous on paper electrophoresis at pH

8.6 and migrated with a mobility corresponding to that of the γ_2 -globulins. The sedimentation constant of this preparation was 0.5S. Further purification was achieved by filtration through a Sephadex G-75 column affording 1 major and 2 minor peaks. On starch gel electrophoresis at pH 8.6 (Figure) the major fraction revealed a single band⁶.

Zusammenfassung. Eine homogene Fraktion wurde aus normalem Humanplasma isoliert. Die Sedimentationskonstante dieser Globulinfraktion erwies sich als 0.5S und ihre elektrophoretische Beweglichkeit entsprach derjenigen der γ_2 -Globuline.

R. B. NIMBERG, L. LARSEN and K. SCHMID

Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, Boston University Medical Center and Massachusetts Department of Public Health, Institute of Laboratories, Boston (Massachusetts 02118, USA), 20th March 1967.



Starch gel electrophoresis of the 0.5S γ_2 -globulin in pH 8.6 borate buffer. The protein migrated toward the cathode (—). The slot of application is indicated by (A).

¹ A. LUNDBLAD and I. BERGGÅRD, *Biochim. biophys. Acta* 57, 129 (1962).

² S. TAKAHASHI and K. SCHMID, *Biochim. biophys. Acta* 82, 627 (1964).

³ T. IKENAKA, D. GITLIN and K. SCHMID, *J. biol. Chem.* 240, 2868 (1965).

⁴ T. IWASAKI and K. SCHMID, *J. biol. Chem.*, in press.

⁵ E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES JR., D. J. MULFORD JR., J. N. ASHWORTH, M. MELIN and H. L. TAYLOR, *J. Am. chem. Soc.* 68, 459 (1946).

⁶ This investigation was supported by grants from the National Institute of General Medical Sciences, U.S. Public Health Service (Nos. GM-10374 and 1-K3-GM-32,160).