

the time for the formation of mixed anhydride with ethyl chloroformate was shortened to less than 10 min. Our experiments made under the same conditions (experiment 2) and under conditions that are known to diminish racemization (experiment 3) could not entirely confirm this statement.

The 'inverse method'⁹ leads on our model also to racemization. The procedure of ANDERSON¹⁰ performed with *N*-methylmorpholine and not with NEt_3 gave, however, peptides with retained configuration (experiment 5).

The $-\text{OSu}$ ¹¹ and the 8-OQ¹² esters of *N*-protected dipeptides undergo aminolysis without being racemized. Such esters cannot be obtained in an optically pure form when they are prepared directly through reactive intermediates (experiments 7 and 9). The esterification of *N*-protected dipeptides with bromoacetonitril⁴, however, gives optically homogenous cyanomethylesters which undergo aminolysis without racemization (experiments 10 and 11).

No loss of optical activity has been found when the acid azide method was used (experiments 12 and 13).

By the stepwise elongation of the peptide chain from the carboxyl end, the extent of racemization of each newly formed peptide bond (experiments 6a and 6b) can be controlled in a microscale by the presently proposed method.

Zusammenfassung. Empfindliche Methode zur Bestimmung der Racemisierung im Laufe der Peptidsynthese:

N-Acylaminosäure oder Peptide werden als Schutz der Aminogruppe der acylierenden Säure benutzt.

E. TASCHNER, Ł. LUBIEWSKA, M. SMULKOWSKI
and H. WOJCIECHOWSKA

*Laboratory of Peptide Chemistry,
Institute of Technology,
Gdańsk (Poland), 12 December 1967.*

⁹ T. H. APPLEWHITE and J. S. NELSON, *Tetrahedron Lett.*, 15, 819 (1964).

¹⁰ G. W. ANDERSON, J. E. ZIMMERMAN and F. M. CALLAHAN, *J. Am. chem. Soc.* 89, 5012 (1967).

¹¹ G. W. ANDERSON, F. M. CALLAHAN and J. E. ZIMMERMAN, *J. Am. chem. Soc.* 89, 178 (1967).

¹² H. D. JAKUBKE and A. VOIGT, *Chem. Ber.* 99, 2419 (1966).

¹³ TH. WIELAND and H. BERNHARD, *Justus Liebigs Annln. Chem.* 572, 190 (1951).

¹⁴ G. W. ANDERSON, J. E. ZIMMERMAN and F. M. CALLAHAN, *J. Am. chem. Soc.* 86, 1839 (1964).

¹⁵ J. C. SHEEHAN and G. P. HESS, *J. Am. chem. Soc.* 77, 1067 (1955).

¹⁶ J. P. GREENSTEIN and M. WINITZ, *Chemistry of the Amino Acids*, (John Wiley and Sons, Inc. New York, London 1961), Vol. 2, p. 958.

Bestimmung der Transferrintypen bei Rindern durch vertikale Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Bisher wurde die Untersuchung der Transferrintypen auf Polyacrylamid durch Disk-Elektrophorese beschrieben¹. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Stärkegelelektrophorese liegt darin, dass das synthetische Polyacrylamidgel chemisch besser definiert ist, teilweise aber auch eine bessere Auftrennung der Proteine stattfindet. Der Nachteil der Disk-Elektrophorese liegt in der schwierigen Vergleichbarkeit der Proben untereinander.

Um diesen Nachteil auszuschalten, verwenden wir das Verfahren der Disk-Elektrophorese in einer Apparatur, die ein direktes Vergleichen der Serumtransferrintypen untereinander und mit einem Standard erlaubt.

Methodik. Als Elektrophoreseapparat wurde eine Vertikalelektrophorese nach RAYMOND² (E-C Apparatus Corporation, Philadelphia), als Puffer für die Elektrodenkammern ein *Tris*-Glycinpuffer (6,0 g *Tris*, Glycin 28,8 g/l) pH 8,5 verwendet. Das Gesamtgel besteht aus 3 verschiedenen Gelen, das unterste zum leitenden Abdichten der unteren Elektrodenkammer gegen den Pufferraum, das mittlere zum Auftrennen der Probe und das oberste zum Vortrennen der Probe.

Für diese Gele sind folgende Lösungen notwendig: (A) Acrylamid (Schuchardt) 150 g, *Bis* (N,N'-Methylenbis acrylamid) 2 g, *Tris* 45,7 g, 1 N HCl 60 ml, gelöst in 500 ml H₂O. (B) Acrylamid 25 g, *Bis* 3 g, *Tris* 8 g, 1 N HCl 60 ml, gelöst in 500 ml H₂O. (C) Ammoniumpersulfat 1,4 g in 100 ml H₂O.

12,5 mA werden mit dem gleichen Volumen Wasser, 0,4 ml TMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, Fa. Fluka) und 0,5 ml C vermischt. Diese Lösung wird blasenfrei in die schräg gestellte Apparatur gegossen.

Nach dem Auspolymerisieren dieser Mischung (10 bis 15 min) wird die mittlere Gellösung bestehend aus 25 ml A, 25 ml H₂O, 0,8 ml TMED, 1 ml C und 0,16 ml Tertiärbutylaminoäthylacrylat (Rohm und Haas, Philadelphia) in die vertikal gestellte Apparatur eingebracht.

Der das Gel enthaltende Spalt wird bis 1 cm unter die Höhe der inneren Kühlplatte mit dieser Lösung angefüllt. In den freibleibenden Raum wird vorsichtig Wasser eingebracht, ohne dass eine Vermischung mit der Gellösung stattfindet. Dadurch wird der direkte Kontakt mit Luft vermieden und eine glatte Oberfläche der Gelschicht erreicht. Polymerisationsdauer 20–25 min.

Aus der nun waagrecht gelegten Apparatur wird das Wasser möglichst vollständig entfernt, Wasserreste auf der Geloberfläche können ein Anpolymerisieren des obersten Gels an das mittlere verhindern. Die Lösung für das oberste Gel wird in die Apparatur gegossen (25 ml B, 25 ml H₂O, 0,8 ml TMED, 1 ml C). In diese Flüssigkeit wird der Probenteiler eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Gels (20–25 min) wird das an der Rückseite des Probenteilers befindliche Gel entfernt, der Apparat senkrecht gestellt und die Kammern mit Puffer gefüllt. Der Probenteiler kann dann vorsichtig herausgezogen werden.

Die Proben können mittels einer Mikropipette in die vorgeformten Schlitzte gebracht werden, das Serum ist

¹ W. H. RAUSCH, T. M. LUDWICK und D. F. WESELI, *J. Dairy Sci.* 48, 720 (1965).

² S. RAYMOND, *Clin. Chem.* 8, 455 (1962).

spezifisch schwerer als der Puffer und legt sich am Boden in gleichmässig dünner Schicht an.

Die Elektrophorese wird bei einer Stromstärke von 100 mA und einer Anfangsspannung von 250 V, die innerhalb von 3 h auf 400 V ansteigt, durchgeführt. Die Stromstärke wird während der Versuchsdauer konstant gehalten.

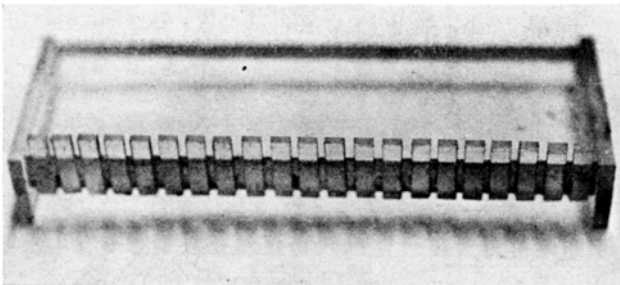


Fig. 1. Probenteiler aus Plexiglas, für 21 Proben mit konisch zulaufenden Schlitzformen. Diese Form erleichtert das Herausziehen des Teilers wesentlich.

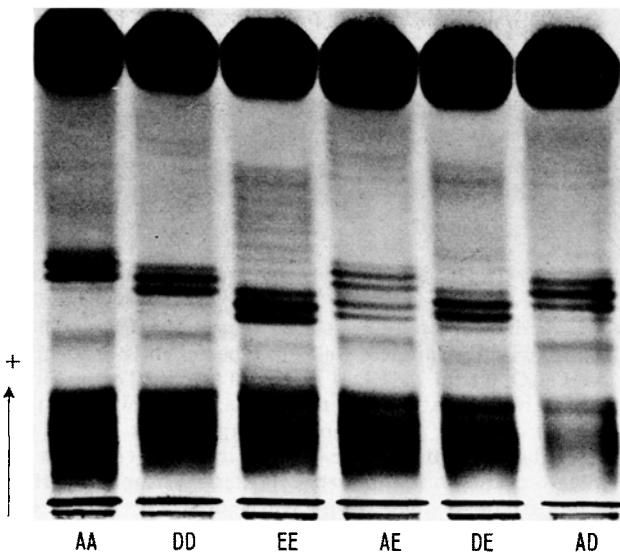


Fig. 2. Von links nach rechts die drei Homozygoten AA, DD, EE und die zugehörigen Heterozygoten AE, DE, AD.

Das Gel wird nach beendeter Elektrophorese mit Amidoschwarz 10 B in Methanol-Eisessig-Wasser gefärbt und mit dem reinen Lösungsmittel entfärbt.

Ergebnisse. Figur 2 stellt die erhaltene Auftrennung der Serumproteine der Rinder dar: Die starken Banden im β -Globulin-Bereich sind die verschiedenen genetisch determinierten Transferrintypen. Der auf Polyacrylamidgel erhaltene Typ stimmt in jedem Fall mit dem auf Stärke erhaltenen überein.

Nach dieser Methode wurden bisher 997 Rinder untersucht. Davon gehörten 583 der Rasse Fleckvieh und 414 der Rasse Pinzgauer an. Dabei ergab sich die in der Tabelle dargestellte Genverteilung.

Die Ergebnisse bei den Pinzgauern sind abweichend von den kürzlich gefundenen³. Um zu einem endgültigen Resultat bei dieser Rasse zu gelangen, werden weitere Untersuchungen durchgeführt.

Rasse	Anzahl	TfA	TfD	TfE
Fleckvieh	583	0,2102	0,7538	0,036
Pinzgauer	414	0,3901	0,5072	0,1027

TfA, TfD, TfE, Frequenzen der Genotypen des Transferrins.

Summary. 997 samples of cattle serum were separated by means of polyacrylamidegelelectrophoresis and the frequency of transferrin phenotypes were determined. The electrophoresis was carried out in outfit for vertical gel electrophoresis according to RAYMOND². For better resolution of proteins 2 gels of different density were used for separation. The method offers the possibility to compare the samples directly.

R. EBERMANN und H. BODENSEHER

Institut für Chemie, Hochschule für Bodenkultur, Wien (Österreich), 2. November 1967.

³ F. TUREK, R. EBERMANN, H. BODENSEHER und G. STEINACKER, Wiener tierärztl. Mschr. 54, 157 (1967).