

den<sup>29, 44</sup>. Bei den H-Komponenten handelt es sich wenigstens um zwei Polypeptide, wobei P<sub>6</sub> (WSA und MEL) gleich, P<sub>9</sub> (WSA) bzw. P<sub>10</sub> (MEL) ungleich wandern (nicht abgebildet). N wurde nicht mit Sicherheit identifiziert. Sie kann als P<sub>10</sub> (WSA) bzw. P<sub>11</sub> (MEL) vermutet werden. Beide wandern gleich weit und weisen ein M auf, das grössenordnungsmässig den Angaben der Literatur<sup>34, 36, 44</sup> entspricht. Die Molekulargewichte der Hauptkomponenten betragen ( $\pm 2-3\%$ ): H (P<sub>6</sub>) 68 000, RNP (P<sub>7</sub>) 56 000, N (P<sub>10</sub>) 25 000.

Es sind vor allem immunologische Argumente, die zeigen, dass bestimmte tierische RNA-Viren in der Lage sind, Wirtsmaterial in ihre Hülle zu übernehmen. So erwirbt z.B. der an EAT adaptierte Influenzastamm WSA die Eigenschaft, Mäuse gegen EAT zu immunisieren. Mit der SDS-PAGE wurden Proteinbestände von WSA untersucht, das auf verschiedenen Wirten gewachsen war (Allantoisflüssigkeit des bebrüteten Hühnereis, EAT im Aszites der Maus und in vitro). Da mit dieser empfindlichen Methode keine Unterschiede gefunden wurden, ist wahrscheinlich, dass die festgestellten wirtsbedingten biologischen Unterschiede nicht durch Inkorporation von Wirtspolypeptiden erklärt werden können. Vielmehr dürfte es sich um den Einbau von Lipoiden und Zuckern handeln.

*Summary.* Evidence is mainly indirect that certain animal RNA viruses integrate host material into their envelope. For example, influenza adapted to Ehrlich ascites tumor is immunogenic against the tumor cells in mice. However, even in polyacrylamide, it was impossible to find significant differences in protein composition of influenza WSA grown in different hosts, whereas differences between strains could easily be detected. The conclusion is that host protein integration is improbable.

H. KOBLET

*Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität, Gloriastrasse 32, CH-8006 Zürich (Schweiz), 16. Juni 1970.*

<sup>44</sup> W. G. LAVER, J. molec. Biol. 9, 109 (1964).

Reinigung von F-Antigen<sup>1</sup>

1968 beschrieben FRAVI und LINDENMANN<sup>2, 3</sup> einen präzipitierenden Antikörper, der durch Immunisierung von Inzuchtmäusen mit Leberextrakten andersstämmiger Inzuchtmäuse gewonnen wird (Tabelle). Gleichstämmiges Antigen induziert zwar keinen Antikörper, doch reagiert einmal gebildeter Antikörper mit gleichstämmigem Antigen und imponiert als Autoantikörper. Das Antigen, im folgenden F-Antigen genannt, findet sich in Lebern und Nieren sämtlicher Mäuse und vieler anderer Säuger. Die Situation erscheint vor allem aus folgendem Grund paradox: gemäss Tabelle lassen sich Stämme B und D durch keinen Extrakt immunisieren, so dass man vorerst annimmt, B und D enthielten alle möglichen Determinanten und seien deswegen refraktär. Wäre das der Fall, so müssten B und D sowohl A wie auch C immunisieren. Das ist nicht der Fall.

Wir stellten uns die Aufgabe, F-Antigen einer Stoffklasse zuzuordnen, zu isolieren und vielleicht zu identifizieren, um etwas über Immunogenität und Reaktivität aussagen zu können. Wir berichten im folgenden über die Isolierung und einige Eigenschaften des F-Antigens. Biologische Funktion und Ursache des paradoxen immunogenen Verhaltens sind noch nicht bekannt.

*Material und Methoden.* F-Antigen wurde semiquantitativ durch Verdünnungsreihen nach Ouchterlony bestimmt; Antikörperquelle ist Mäuseaszites. Eine Einheit von F-Antigen entspricht der Konzentration, die eine noch eben sichtbare Präzipitationslinie ergibt. Unter «Aktivität» wird also im folgenden immer nur immunologische Reagibilität verstanden. Protein wurde nach LOWRY<sup>4</sup>, Zucker mit der Anthronmethode<sup>5</sup> bestimmt. F-Antigen wurde aus Lebern folgender Spezies gereinigt: Maus (A, Balb/c, C57, CBA, C<sub>3</sub>H, DBA), Schwein.

*Allgemeines.* F-Antigen findet sich bei der Zellfraktionierung ausschliesslich im Zytosol. Es ist am stabilsten im pH-Bereich 7,5–8,5. Mit steigender Reinheit nimmt die Empfindlichkeit gegen Einfrieren und Auftauen sowie Lyophilisieren zu. Die Stabilität bei 40°C ist vermindert. EtSH<sup>6</sup> wirkt stabilisierend. F-Antigen ist chloroformbeständig; es fällt in einem breiten Bereich zwischen 40% und 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Sättigung bei 4°C und pH 7

aus. Es wird weder durch RNA'ase noch DNA'ase<sup>6</sup>, wohl aber durch Pronase, Trypsin und Chymotrypsin innerhalb von 60 Min völlig inaktiviert. Bei der Elektrofokussierung<sup>7</sup> erscheinen Aktivitäten zwischen pH 6,5 und 7 an verschiedenen Stellen.

*Reinigungsgang.* Rohhomogenate von Lebern (Schere, Turmix, Potter, Dounce) werden von allen partikulären Elementen befreit. Die lösliche Phase wird gegen Puffer A

Induktion von Antikörpern durch F-Antigen in Abhängigkeit vom Stamm

F-Antigen im Extrakt vom Stamm		A	B	C	D
Stamm, reagierend mit Anti-F (+), oder nicht reagierend (—)	A	—	—	+	+
	B	—	—	—	—
	C	+	+	—	—
	D	—	—	—	—

A = A; B = Balb/c, C57Bl6; C = CBA, C<sub>3</sub>H; D = DBA.

<sup>1</sup> Arbeit mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Kredit Nr. 5254.3). Herrn Dr. H. MOSIMANN danke ich für die Hilfe bei der analytischen Ultrazentrifugation, Frl. U. KOHLER für Mitarbeit und Herstellung der Skizzen.

<sup>2</sup> G. FRAVI und J. LINDENMANN, Nature, Lond. 218, 141 (1968).

<sup>3</sup> G. FRAVI, Pathol. Microbiol. 31, 257 (1968).

<sup>4</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

<sup>5</sup> J. H. ROE, J. biol. Chem. 212, 335 (1955).

<sup>6</sup> Abkürzungen und Bezugsquellen: EtSH, Beta-Mercaptoethanol (Fluka); CM-Zellulose, Carboxymethyl-Zellulose (Whatman); DEAE-Zellulose, Diaethylaminoethyl-Zellulose (Whatman); DNA'ase, Desoxyribonuklease (Calbiochem); RNA'ase, Ribonuklease (Calbiochem); SDS, NaLaurylsulfat (Serva); PAGE, Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

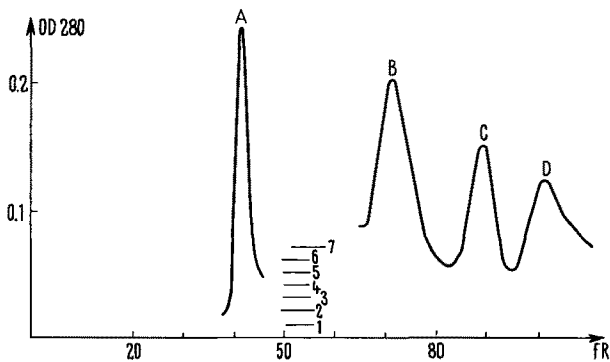


Fig. 1. Verhalten von F-Antigen verschiedener Spezies bei verschiedenen Temperaturen, Konzentrationen und Ionenstärken bei Chromatographie auf Sephadex G 100. Material nach Chromatographie auf CM-Zellulose in Puffer A. 95×2,3 cm G 100 Säule in Puffer A. 12 ml/h; 3 ml/Fraktion. —, Kalibrierung der Säule mit folgenden Reinsubstanzen: A, blaues Dextran (2 mg); B, Chymotrypsin (4 mg); C, Lysozym (4 mg); D, Cytochrom (2 mg). Horizontale Balken: Elutionsposition (F+).

	mg Pro- tein auf- getra- gen	Volu- men auf- getra- gen	Spezies	Puffer	Tem- pera- tur  (°C)	Bemer- kungen
1	9	0,9	Schwein	A	4	—
2	9	0,9	Schwein	A	20	—
3	36	2,0	Balb/c	A	4	} auf CM nicht retin. Material CHCl <sub>3</sub> - behandelt
4	36	2,0	Balb/c	A	20	
5	35	2,0	Balb/c	A(–EtSH)	4	
6	3	1,0	Balb/c	A	4	
7	3	0,3	Balb/c	A(0,5 M- NaCl)	4	

(0,0175 M Phosphatpuffer, pH 7; 0,1% EtSH<sup>6</sup>) dialysiert und geklärt. Mit Puffer A äquilibrierte DEAE-Zellulose bindet F-Antigen des Schweins, nicht aber der Maus. Positive Fraktionen werden gegen Puffer B (0,01 M Phosphatpuffer, pH 5,3; 0,1 M NaCl; 0,1% EtSH<sup>6</sup>) dialysiert und auf CM-Zellulose chromatographiert. Hier zeigen sich mehrere F-Antigen-Aktivitäten: F-Antigene aller Mäusestämme müssen mit Puffer C (0,01 M Phosphatpuffer, pH 6,3; 0,3 M NaCl; 0,1% EtSH<sup>6</sup>) entwickelt werden; zudem zeigen Balb/c und DBA (also nicht immunisierbare Stämme) sowie das Schwein eine nicht retinierte Aktivität. Positive Fraktionen werden neutralisiert und geklärt. Dann wird F-Antigen mittels 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konzentriert, dialysiert gegen Puffer A und durch Sephadex G 75 oder Sephadex G 100 filtriert. Rechromatographie durch Sephadex ist bis dahin das einzige Verfahren, das bei allen Stämmen saubere Präparate mit tragbarer Aktivitätseinbusse liefert. Andere Schlußschritte wie Elektrofokussierung<sup>7</sup>, Immunoabsorption<sup>8</sup> oder Chromatographie auf OH-Apatit führen nur bei bestimmten Stämmen oder Spezies zum Erfolg.

Auf Sephadex ist die Elutionsposition vom Stamm, von der Temperatur, von der aufgetragenen Proteinmenge sowie von der Konzentration des Eluens und vom Reinheitsgrad des Präparates unabhängig. Die Elutionsposition entspricht einem Molekulargewichtsäquivalent zwischen 40 000 und 45 000 (Figur 1). Die beste spezifische Aktivität (C<sub>3</sub>H) beträgt 150 E/mg Protein bei einer solchen von 0,5 E/mg im Rohhomogenat. F-Antigen wurde gereinigt aus A, Balb/c, C<sub>3</sub>H und DBA sowie aus Schweineleber.

<sup>7</sup> H. SVENSSON, Acta chem. scand. 15, 325 (1961); 16, 456 (1962)  
<sup>8</sup> S. CARREL, H. GERBER und S. BARANDUN, Nature, Lond. 221 385 (1969).

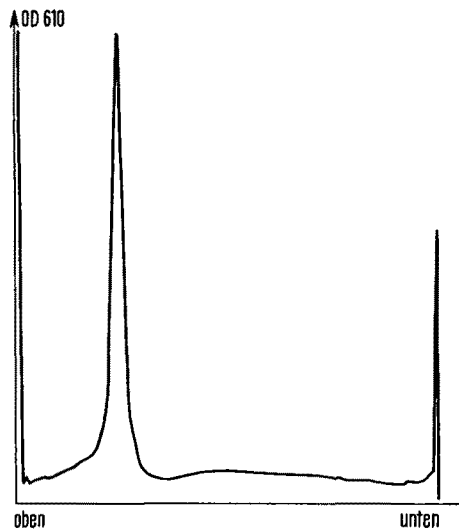


Fig. 2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese von F-Antigen, ohne SDS. Gelford Gelscan bei 610 nm von gereinigtem A-Material. 10 µl wurden auf 5% Gele (Acrylamid 5%, Bisacrylamid 0,13%, Temed 0,05%, Ammoniumpersulfat 0,075%, Na-Phosphatpuffer 0,1 M, pH 8,0) aufgetragen und so lange der Elektrophorese bei 10 mA pro Röhrchen und Kühlung auf 10°C unterworfen, bis der Marker Coomassieblau den unteren Gelrand erreichte. Lösung: 10 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 8. Die Kurven sind identisch bei Verwendung von Balb/c (beide Fraktionen), C<sub>3</sub>H und DBA.

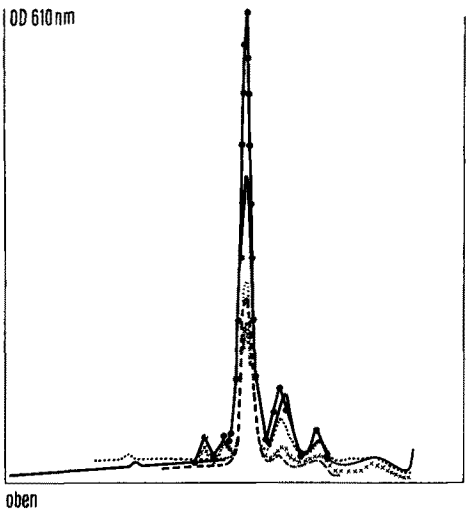


Fig. 3. Polyacrylamidgel-Elektrophorese von F-Antigenen, mit SDS. Material aus verschiedenen Stämmen: 10 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer pH 8, 1% SDS. 10 µl auf 5% Gelen, gleich wie in der Legende zu Figur 2 beschrieben, enthaltend 0,1% SDS. Bedingungen und Gelscan wie bei Figur 2 angegeben. ●—●, Gemisch (je 3 µl der im folgenden angegebenen Präparate); —, C<sub>3</sub>H; ---, C<sub>3</sub>H, chloroformbehandelt; ×××, Balb/c, auf CM-Zellulose retiniertes Material; ····, DBA, auf CM-Zellulose retiniertes Material. Kurven identisch bei Verwendung von A und Balb/c, auf CM nicht retiniertes Material.

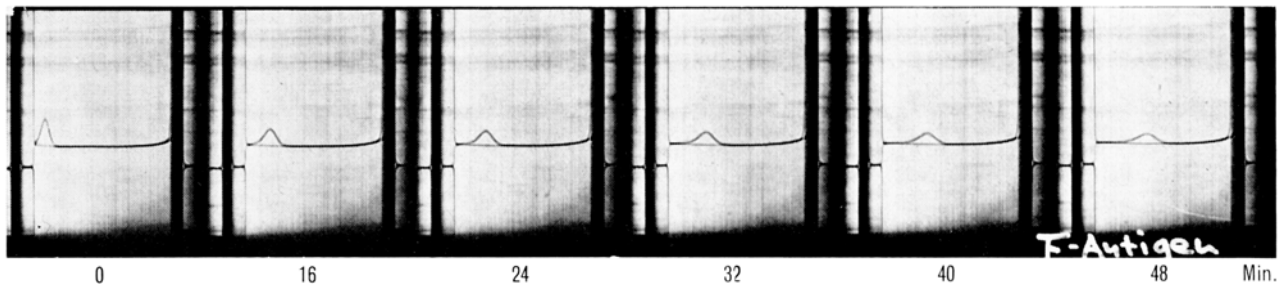


Fig. 4. Analytische Ultrazentrifugation von F-Antigen. Material: Balb/c, auf CM-Zellulose nicht retiniertes Material (8 mg/ml). Lösungsmittel: 0,01 M Phosphatpuffer pH 8, 0,1 M NaCl, 0,1% EtSH. Laufbedingungen: Doppelsektorzelle mit Quarzfenster, 59780, 20°C.

**Untersuchungen an gereinigten F-Antigenen.** In der PAGE<sup>6</sup> zeigen gereinigte F-Antigene eine einzige Bande, die stets gleich weit wandert (Figur 2). Nach Zusatz von SDS<sup>9</sup> ergibt sich in der PAGE ein komplexeres, aber bei allen Stämmen gleiches Bild. Die Hauptkomponente weist ein Molekulargewicht um 40 000 in der komparativen PAGE auf (Figur 3).

F-Antigene sind gelbe Proteine mit einem Extinktionsmaximum bei 410 nm neben dem im übrigen für Proteine typischen Absorptionsspektrum. In der analytischen Ultrazentrifuge (Figur 4) wandert F-Antigen als homogene symmetrische Komponente von 5,4 s. Mit der Anthronmethode<sup>5</sup> kann ein Zuckergehalt von rund 1 Glukoseäquivalent pro 40 000 Molekulargewicht nachgewiesen werden.

**Diskussion.** Die bis dahin vorliegende Information ist unzureichend, um das immunologische Verhalten der F-Antigene zu deuten. Ein Zusammenhang mit Histoinkompatibilitäts-Antigenen (H-2) ist unsicher und unwahrscheinlich<sup>10</sup>. 2 nicht immunisierbare Mäusestämme

haben 2 Antigene; sie könnten demnach heterozygot in Bezug auf F sein. Aussagekräftige Resultate werden vermutlich in der Aminosäurezusammensetzung bzw. -sequenz zu finden sein.

**Summary.** F-antigens are glycoproteins with  $s_{20}^c$ , 0.1 M NaCl = 5.4 and a main component in SDS-polyacrylamide of molecular weight of 40,000. Separation of F-antigens is described; with the methods used they are indistinguishable.

F. PESARO und H. KOBLET

*Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich, Gloriastrasse 32, CH-8006 Zürich (Schweiz), 16. Juni 1970.*

<sup>9</sup> A. E. SHAPIRO, E. VIÑUELA and J. V. MAIZEL, *Biochim. biophys. Res. Commun.* 28, 815 (1967).

<sup>10</sup> M. BERTSCHMANN, persönliche Mitteilung.

## Use of Amino Acid-Analyzer for Identification of <sup>3</sup>H Labelled C-Terminal Amino Acid<sup>1</sup>

A new method for the determination of C-terminal amino acid in peptides and proteins by selective tritium labelling is reported by MATSUO et al.<sup>2</sup>. It is based on oxazolone formation by the action of acetic anhydride followed by base-catalyzed hydrolysis of oxazolone ring; the C-terminal <sup>3</sup>H-labelled amino acid was detected, after complete hydrolysis of peptides or proteins, by paper chromatography with the aid of radiochromatogram-scanner<sup>3</sup>. G. N. HOLCOMB et al.<sup>3</sup> have used for the same purpose thin-layer chromatography and the spots were cut-off from the plates and transferred into vials containing a liquid scintillator.

The purpose of the present paper is to document a new sensitive and unambiguous procedure based on the resolving power of the amino acid-analyzer. This procedure, because its sensitivity, is especially suitable for large peptides or proteins where the amount of C-terminal amino acid represents only a small portion of total amino acids.

**Materials and methods.** Eledoisin-Octopus was kindly supplied by Farmitalia. Ribonuclease and glutamyl-valyl-phenylalanine were purchased from SIGMA Chem. Co., tritiated water from NEN Chemicals GmbH, Liquifluor 25x from Nuclear Chicago. All reagents were pure chemicals.

Ribonuclease (2 mg) or peptide (0.2–0.5 mg) was dissolved in 0.1 ml of <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O (100 mC) plus 0.2 ml of pyridine

and 0.05 ml of acetic anhydride. The mixture was allowed to stand at room temperature for 5 h. The solvents were removed in vacuum at 40°C and the residue was washed 6 times with 2 ml of distilled water. The sample was hydrolyzed with HCl 6N at 110°C for 24 h in vacuum sealed tube. The hydrolyzate was dried over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and KOH in vacuum. The residue was dissolved in 0.2 M citrate buffer pH 2.2. A 0.5 ml portion of the above solution was applied to the chromatographic columns of the Unichrom amino acid analyzer. The exit of the flow colorimeter was connected by a teflon capillary tube to a volumetric fraction collector; 2 ml fractions were collected. The ninhydrin colour of the fractions was measured at 570 nm or 440 nm using a Beckman DB spectrophotometer. A 0.8 ml portion of every fraction was introduced into counting vial and successively 0.5 ml of distilled water and 10 ml of scintillation solution were

<sup>1</sup> This work was supported by grants from Ministero della Pubblica Istruzione and Italian Consiglio Nazionale delle Ricerche.

<sup>2</sup> H. MATSUO, Y. FUJIMOTO and T. TATSUNO, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22, 69 (1966).

<sup>3</sup> G. N. HOLCOMB, S. A. JAMES and D. N. WARD, *Biochemistry* 7, 1291 (1968).