

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 PAGE⁶ zeigen gereinigte F-Antigene eine einzige Bande, die stets gleich weit wandert (Figur 2). Nach Zusatz von SDS⁹ 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 Anthronmethode⁵ 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 unwahrscheinlich¹⁰. 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.

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

¹⁰ M. BERTSCHMANN, persönliche Mitteilung.

Use of Amino Acid-Analyzer for Identification of ³H Labelled C-Terminal Amino Acid¹

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.². It is based on oxazolone formation by the action of acetic anhydride followed by base-catalyzed hydrolysis of oxazolone ring; the C-terminal ³H-labelled amino acid was detected, after complete hydrolysis of peptides or proteins, by paper chromatography with the aid of radiochromatogram-scanner³. G. N. HOLCOMB et al.³ 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.

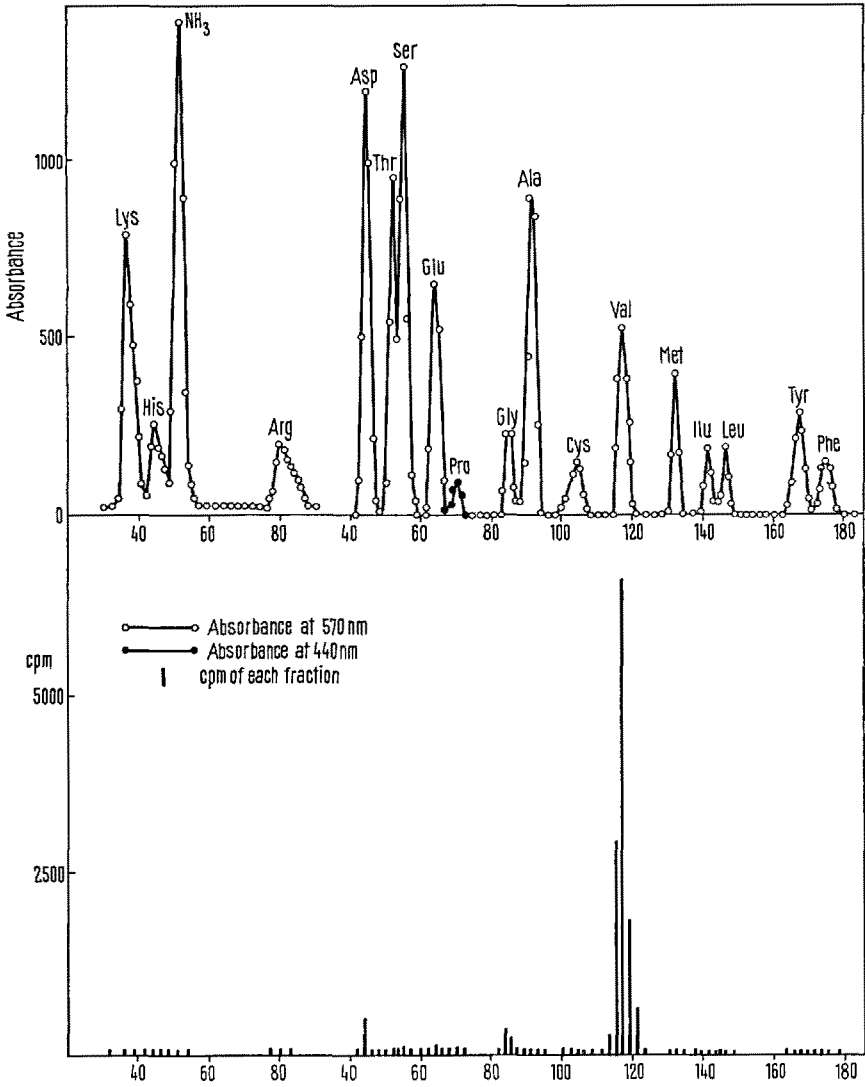
Ribonuclease (2 mg) or peptide (0.2–0.5 mg) was dissolved in 0.1 ml of ³H₂O (100 mC) plus 0.2 ml of pyridine

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 P₂O₅ and KOH in vacuum. The residue was dissolved in 0.2M 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

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

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

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



Top: profile of amino acid analysis of bovine pancreatic ribonuclease. Bottom: radioactivity of each eluate fraction of 2 ml, expressed as cpm.

Protein or peptide (nmoles analyzed)	Ribonuclease	Glutamyl-Valyl-Phenylalanine	Eledoisin-Octopus
	35	210	136
(Counts per minute) *			
Lys	0		0
His	0		
Arg	0		
Asp	900		620
Thr	0		
Ser	174		610
Glu	200	350	0
Pro	0		0
Gly	724		0
Ala	0		0
Cys	0		
Val	26,625	0	
Met	0		2,060
Ile	0		200
Leu	0		0
Tyr	0		
Phe	0	115,115	0

* Expressed as the sum of cpm of all fractions of each amino acid.

added. The composition of scintillation solution was: 1/3 Triton x x 100 and 2/3 Liquifluor diluted with toluene (1:10). The vials were strongly shaken and radioactivity was measured with a Nuclear Chicago liquid scintillation spectrometer.

Results and discussion. In the top of the Figure a profile of amino acid analysis is shown and, in the bottom, the bars represent the radioactivity for each eluate fraction of 2 ml, expressed as cpm.

In the Table the radioactivity values measured in 3 experiments are reported in which we used respectively a protein (ribonuclease), a tripeptide (glutamyl-valyl-phenylalanine) and a polypeptide (eledoisin). The values reported refer to the total volume of the fractions corresponding to each amino acid. The advantages of the method described in comparison with other similar procedures may be summarized as follows.

A better separation of the amino acids joins with a higher reproducibility and precision in the identification of the labelled amino acids. Furthermore the measurement of radioactivity, carried out by putting samples of eluate from amino acid analysis directly in vials containing the scintillation liquid, reduces the loss of volatile

aldehydes that may arise in the reaction between amino acids and ninhydrin. This fact could turn out to be advantageous, especially when such compounds are formed from C-terminal amino acids⁴.

Riassunto. Viene descritta una nuova metodica per la identificazione, in proteine o peptidi, degli amino acidi C-terminali marcati mediante tritiazione selettiva.

I vantaggi di questo procedimento, basato sull'uso dell'amino acid-analyzer, rispetto ad altri analoghi, consistono essenzialmente in una più alta sensibilità ed in

una maggiore riproducibilità e precisione nella identificazione degli amino acidi marcati.

G. CAPPUGI, P. NASSI,
C. TREVES and G. RAMPONI

*Istituto di Chimica biologica dell'Università di Firenze,
Firenze (Italia), 7 July 1970.*

⁴ We are indebted to Mr. G. CAMICI for his skillful technical assistance.

Das Verhalten von Polysacchariden während der Mikroelektrophorese

Es stellt sich das Problem, verschiedene Pflanzengummen, die als Gelier- und Verdickungsmittel verwendet werden, voneinander zu trennen. Wie PADMOYO und MISEREZ¹ beschrieben, eignet sich dazu die Methode der Mikroelektrophorese auf Celluloseacetatfolien unter Verwendung eines Boratpuffers. Damit erhalten die an sich unpolaren Polysaccharidmoleküle eine Ladung, die sie im elektrischen Feld zur Wanderung veranlasst. Es wäre nützlich zu wissen, wie die Wanderungstrecke der Polysaccharide durch die Stromstärke und die Wanderungszeit bestimmt wird.

Verwendet wurde ein Microcell-Elektrophoresegerät der Firma Beckman. Als Träger brauchten wir Folien der Membranfilter-Gesellschaft Göttingen, welche aus Celluloseacetat hergestellt sind. Der Puffer mit einer Boratkonzentration von 0,06 mol/l, einer Ionenstärke von 0,065 und einem pH-Wert von 10,0 wurde konstant gehalten.

Auf der gleichen Folie wurden in verschiedenen Zeitabständen mit Hilfe eines Stempels Gemische von Polysacchariden aufgetragen. Das Sichtbarmachen der Substanzen auf der Folie geschah nach der Methode von PADMOYO und MISEREZ¹.

Da sich die Folie bei der Transparentmachung meistens etwas verzieht, ist es unzweckmässig, die Wanderungstrecke in mm anzugeben. Wir ordneten daher der potentiell maximalen Wanderungstrecke (Entfernung Auftrageort – Befestigungsstelle der Folie) den Wert 1 zu. Die transparenten Folien wurden dann in einem Densitometer ausgemessen und ihre Absorption mit Hilfe eines Schreibers registriert. Die Strecke vom Auftrageort der Substanz bis zur Stelle, an der der Schwerpunkt einer Bande registriert wird, ergibt die Wanderungstrecke w .

Die Experimente ergaben eine lineare Abhängigkeit von w für die ganze Wanderungstrecke (etwa 5 cm) sowohl von der Wanderungszeit, als auch von der Stromstärke, welche während des Experimentes konstant gehalten wurde.

Die Abhängigkeit der Wanderungstrecke von der Wanderungszeit ergibt eine Ursprungsgerade w mit der Steigerung $n = dw/dt$, welche ihrerseits wieder eine Funktion der Stromstärke I ist (Tabelle I):

$$w(t) = n_{(I)} \cdot t \quad (1)$$

Die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit n von der Stromstärke ergab eine Gerade, welche in der Regel

Tabelle I. Mikroelektrophoretische Wanderung w von Gummi arabicum als Funktion der Stromstärke I und der Wanderungszeit t . Steigung $n = dw/dt$

I (mA)	Wanderungstrecke w , Versuchsdauer (min)									$n \cdot 10^{-3}$
	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'	40'	45'	
1	–	–	0,08	–	0,14	–	0,19	–	0,24	5,4
3	–	0,13	0,20	0,28	0,35	–	–	0,55	–	13,5
5	–	0,21	0,32	0,43	0,53	0,64	–	0,86	–	21,2
7	0,15	0,28	0,44	0,58	0,72	0,82	1	1	1	29,0

Tabelle II. Abhängigkeit der Wanderung einiger Polysaccharide im elektrischen Feld von verschiedenen Versuchsparametern

Substanz	m	q
Stärke	$1,57 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Gummi arabicum	3,94	1,75
Tragant	5,0	3,0
Natriumpektat	6,67	0

nicht durch den Ursprung verläuft, wenn auf eine Stromstärke von 0 extrapoliert wird. Die Linearität ist aber für eine Stromstärke ≥ 1 mA praktisch gegeben (Tabelle I):

$$\begin{aligned} n_{(I)} &= m \cdot I + q \\ q &= n\text{-Achsen-Abschnitt} \\ m &= \text{Steigung } dn/dI \text{ im } h; I\text{-Diagramm} \end{aligned} \quad (2)$$

¹ M. PADMOYO und A. MISEREZ, Mitt. eidg. GesundhAmt 58, 31 (1967).