

only to increase the background which became relatively high in any case when cells were surrounded by as yet undispersed hemolymph protein. In the interest of speed, preparations were covered with a cover-slip without sealing and placed immediately under the fluorescence microscope. The microscope employed in these studies was a Zeiss Photomicroscope II equipped with an epicondenser and head containing a 460 nm cut-off dichroic mirror. Excitation was with a HBO-200 mercury arc with a UG-1 primary filter. A secondary 530 nm cut-off filter was also employed. All photographs were taken using Kodak Plus-X 35 mm film. Attempts were made to photograph sequential changes in the same field over a 6 to 7-min period. An achromatic 40X, n.a. 0.85 immersion objective was used throughout these studies.

The general results were clearly in agreement with the findings of DYCKMAN and WELTMAN¹. Only the cytoplasm displayed fluorescence, not the nuclei. Within 6 to 7 min, cytoplasmic fluorescence had developed in virtually every cell in the preparation to some degree.

Of perhaps more interest, however, it also became evident that some cells immediately displayed cytoplasmic fluorescence, while in others, the cytoplasmic fluorescence developed at varying rates over several min (Figure 1a, b, c). An easily identifiable, and the predominant, cell type that fluoresced immediately was the expanded, fragile hyaline hemocyte (coagulocyte) (Figure 2). This is the cell always associated with the formation

of islands of coagulation in unfixed living preparations viewed with phase contrast optics and in fixed and stained preparations. One of the cell types that fluoresced at varying rates over the first several min of the clotting process has been tentatively identified, from comparison with phase optical studies and fixed and stained preparations, as the hyaline hemocyte. This is a particularly interesting finding since some of these hyaline cells were observed to expand and become coagulocytes while others did not during examination of the clotting process with phase contrast optics.

This represents the communication of preliminary findings. We feel that use of the fluorescent probe (ANS) indicates that early changes in hemocytes, or rather hemocyte membranes, can be detected by the action of this probe. It is significant that early changes can be detected in some cells, but develop at varying rates in others. Early fluorescence is considered to be due to immediate membrane alterations in the instantaneously fluorescent cells while the slower development of fluorescence in others in the presence of ANS is related to either maintenance of membrane integrity or slower movement of the dye through the membrane.

We feel that this technique may assist in the development of new insights into the cellular physiology of the insect coagulation response as well as many other intracellular functions involving exposure of hydrophobic groups. More detailed studies of roach hemocytes in coagulation are underway in this laboratory which will be reported in detail later.

Zusammenfassung. Gewisse Hämocyten von *Blatta orientalis* L. zeigten in Gegenwart fluoreszierender 8-Anilin-1-Naphthalensulfonsäure im Lebendpräparat zytoplasmische Fluoreszenz, während die Entwicklung dieser Fluoreszenz in anderen Hämocyten beträchtlich variiert und bis zu 7 min benötigt. Es besteht die Möglichkeit, mit dieser Fluoreszenzprobe Membranveränderungen in Hämocyten zu erfassen.

D. A. BELDEN JR. and R. R. COWDEN

Department of Biological Sciences,
The University of Denver, Denver (Colorado 80210, USA),
5 October 1970.

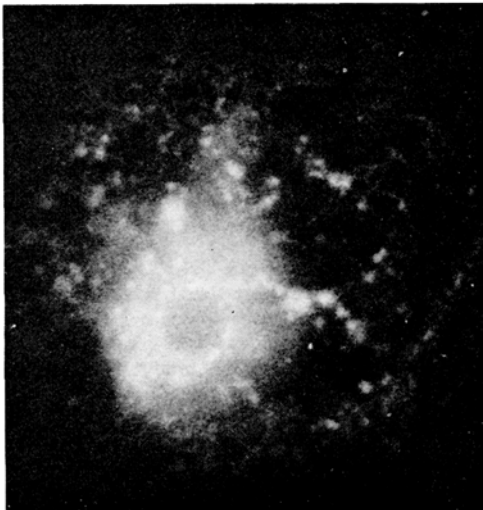


Fig. 2. Expanded, fragile hyaline hemocyte (coagulocyte), 40 sec after introducing the probe.

¹ CH. GREGOIRE, in *The Physiology of Insecta* (Academic Press, New York 1963), p. 153.

² J. DYCKMAN and J. K. WELTMAN, *J. Cell Biol.* 45, 192 (1970).

³ I. TESAKI, A. WATANABE, R. SANDLIN and L. CARNAY, *Proc. natn. Acad. Sci., USA* 61, 883 (1968).

Immunpräzipitation Insulin-verwandter Proteine mit Ziegen-anti-Insulinserum

Nach der Entdeckung des Proinsulins¹ als Precursor in der Insulinbiosynthese gelang es, Proinsulin und weitere Insulin-verwandte Proteine aus kommerziellen Insulinpräparaten zu isolieren^{2,3}.

Bei Anwendung von Anti-Insulinserum und radioaktiv markiertem Insulin als Tracer konnten Kreuzreaktionen von Proinsulin, Intermediär (Proinsulin ohne Lys₅₉-Arg₆₀) und Dimer (zwei kovalent gebundene Insulinmoleküle) mit Insulinantikörpern nachgewiesen werden⁴. Verglichen mit Insulin zeigte Proinsulin ungefähr die halbe Hemm-

wirkung hinsichtlich der Bindung des radioaktiv markierten Insulins durch das Anti-Insulinserum. Die antigene Reaktivität von Intermediär und Dimer war grösser als die des Proinsulins.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, zu prüfen, ob präzipitierendes Ziegen-anti-Insulinserum (GAIS) auch mit dem Proinsulin und Intermediär Immunpräzipitate bildet.

Material und Methoden. Proinsulin und Intermediär wurden aus kristallinem Rinderinsulin (VEB Berlin-

Chemie) durch Gelfiltration über Sephadex G-50 (Pharmacia Uppsala) und Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose (Serva-Heidelberg) gewonnen^{2,5}.

Extraktion von Human-Pankreas mit Phosphorsäure-Alkohol⁶ und Fällung mit Ammoniumsulfat bei pH 3,4 oder Schwefelsäure-Alkohol-Extraktion⁷ ergaben rohes Humaninsulin, aus dem durch mehrmalige Gelchromatographie über Sephadex G-50 mit 1M CH₃CO₂H und 5M CH₃CO₂H/0,15M NaCl das Proinsulin abgetrennt werden konnte.

Durch Polyacrylamid-Diskelektrophorese in Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3, wurde die Reinheit der präparierten

Substanzen überprüft. Zur Anfärbung der Proteine wurde Amidoschwarz 10 B (Serva Heidelberg) verwendet und der überschüssige Farbstoff elektrophoretisch entfernt⁸.

Anti-Insulinserum wurde durch Immunisierung männlicher Ziegen mit Rinderinsulin, emulgiert in komplettem Freund'schem Adjuvans, gewonnen. Jedes Tier erhielt 3–4mal in dreiwöchentlichen Abständen 70–100 mg 10fach rekristallisiertes Rinderinsulin (VEB Berlin-Chemie).

Der Nachweis präzipitierender Insulinantikörper erfolgte im Doppeldiffusionstest und in der Mikroimmuno-elektrophorese. Als Trenn- und Diffusionsmedium wurde 2%iges Agargel in Michaelis-Puffer (pH 8,2, Ionenstärke 0,05) verwendet. Die Feldstärke betrug 6 V/cm bei einer Laufzeit von 80 min, die Diffusionszeit 24 h.

Ergebnisse. Mit Hilfe eines Ziegen-anti-Insulinserums ist es erstmalig gelungen, die Kreuzreaktionen von Rinderproinsulin und Intermediär durch Immunpräzipitation

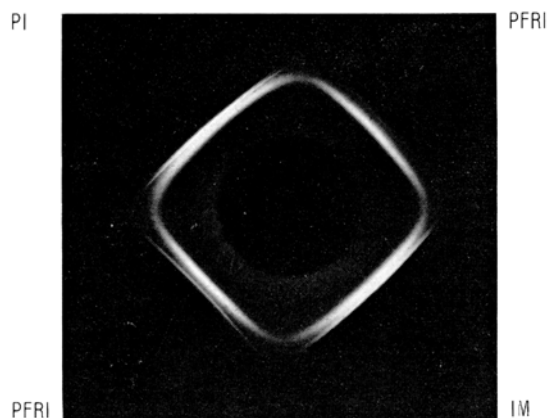


Fig. 1. Immunpräzipitation von proinsulinfreiem Rinderinsulin (PFRI), Intermediär (IM) und Proinsulin (PI). In der Mitte ist das komplette Ziegen-anti-Insulinserum (GAIS) aufgetragen.

¹ D. F. STEINER, Trans. N.Y. Acad. Sci. 30, 60 (1967).

² D. D. SCHMIDT und A. ARENS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1157 (1968).

³ J. SCHLICHTKRULL, J. BRANGE, H. EGE, O. HALLUNG, L. G. HEDING, K. JORGONSON, J. MARKUSSEN, P. STAHNKE, F. SUNDBY und AA. VELUND, Fifth Annual Meeting European Association for the Study of Diabetes, Montpellier, 16–18 September (1969).

⁴ A. H. RUBENSTEIN, D. F. STEINER, S. CHO, A. M. LAWRENCE und L. KIRSTENS, Diabetes 18, 598 (1969).

⁵ D. F. STEINER, O. HALLUNG, A. RUBENSTEIN, S. CHO und C. BAYLISS, Diabetes 17, 725 (1968).

⁶ R. L. JACKSON, E. W. SHNEY, E. L. GRINNAN und R. M. ELLIS, Diabetes 18, 206 (1969).

⁷ S.-S. WANG und F. H. CARPENTER, J. biol. Chem. 240, 1619 (1965).

⁸ H. R. MAURER, Disk-Elektrophorese (Walter de Gruyter und Co., Berlin 1968).

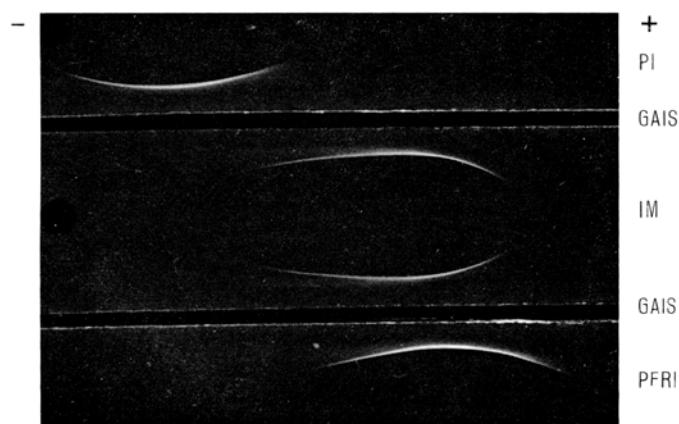


Fig. 2. Immunoelktrophorese von proinsulinfreiem Rinderinsulin (PFRI), Intermediär (IM) und Proinsulin (PI) in Agargel bei pH 8,2 in Michaelis-Puffer. In den Gräben ist Ziegen-anti-Insulinserum (GAIS) aufgetragen.

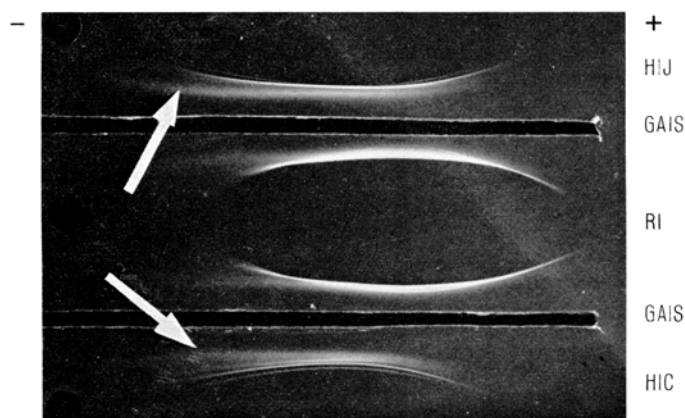


Fig. 3. Immunoelktrophoretische Auftrennung von proinsulinfreien Humaninsulinen (HIJ: extrahiert mit Phosphorsäure-Alkohol; HIC: mit Schwefelsäure-Alkohol) und 10fach rekristallisiertem Rinderinsulin (RI) in Agargel bei pH 8,2 in Michaelis-Puffer.

nachzuweisen (Figur 1). Aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten im Agargel lässt sich die Auftrennung von Insulin, Proinsulin und Intermediär erreichen (Figur 2). In Humaninsulinpräparaten, die nach den oben erwähnten Verfahren hergestellt werden, konnte aus disk- und immunoelektrophoretischen Untersuchungen (Figur 3) auf das Vorhandensein weiterer, noch nicht beschriebener Komponenten mit antigener Wirkung geschlossen werden.

Diskussion. Kreuzreaktionen von Insulinantikörpern mit Proinsulin, Intermediär und Dimer konnten bisher nur durch kompetitive Hemmung nachgewiesen werden. Mit einem mit Rinderinsulin stark präzipitierenden Ziegen-anti-Rinderinsulinserum war es möglich, die Kreuzreaktionen von Rinderproinsulin und Intermediär durch Immunpräzipitation nachzuweisen. Aus Figur 1 sind keine visuellen Unterschiede in der Stärke der Präzipitationslinien zwischen den einzelnen Komponenten zu erkennen. Durch Anwendung der Immunoelktrophorese im Agargel lassen sich antigene Komponenten in Insulinpräparaten analytisch nachweisen. Während bisher ausschliesslich diskelektrophoretische Verfahren zur Überprüfung von Insulinen auf ihren Gehalt an Proinsulin und den genannten Komponenten eingesetzt wurden, kann die hier beschriebene Methode als spezifischer und empfindlicher Nachweis für Insulin-verwandte Proteine verwendet werden. Die diffusen Präzipitationsbögen der proinsulinfreien Humaninsulinpräparate zeigen eine Insulin-verwandte Komponente mit geringerer elektrophoretischer Mobilität. Auch in der Diskelektrophorese liess sich diese Komponente nachweisen⁹.

Schon STEINER et al.⁵ hatten bei der Isolierung von Rinderproinsulin auf die Existenz von basischen, höher-

molekularen Proteinen hingewiesen, die offenbar mit dem Proinsulin verwandt sind.

Die zur Zeit gebräuchlichen Methoden der kombinierten Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie sind zeitaufwendig und mit grösserem Substanzverlust verbunden. Die elektrophoretische Auftrennung im Agargel bietet eine Alternative zur Gewinnung hochgereinigter Insuline, analog dem Prinzip zur Glukagon-Insulin-Trennung¹⁰.

Summary. Bovine insulin, proinsulin, and intermediate form were prepared by Sephadex gelfiltration and chromatography on DEAE-cellulose. Using a goat anti-insulin serum, the cross-reactions of proinsulin and intermediate form could be shown by immuno-precipitation. A method is described for the separation of proinsulin from insulin in agar gel. New compounds related to proinsulin or insulin were found in human insulin preparations by means of immunoelectrophoresis.

M. ZIEGLER¹¹, K.-D. KOHNERT
and U. KARG †

Zentralinstitut für Diabetes «Gerhardt Katsch»,
Experimenteller Bereich, 2201 Karlsburg (DDR),
6. November 1970.

⁹ H. ZÜHLKE, K.-D. KOHNERT, M. ZIEGLER und U. KARG †, Publikation in Vorbereitung.

¹⁰ M. ZIEGLER und H.-G. LIPPMANN, *Acta biol. med. germ.* 21, 733 (1968).

¹¹ Wir danken Frl. B. LAARS und Herrn D. KLATT für ausgezeichnete technische Mitarbeit.

Inhibition by Lanthanum Ions of ADP-Induced Platelet Aggregation

ADP-induced platelet aggregation requires extracellular divalent cations, especially calcium^{1,2}. The function of this metal ion is poorly understood, although several mechanisms might be considered: formation of an active CaADP complex³, Ca-uptake into the cells during aggregation, binding of Ca to the membrane, involvement in bridges between adjacent platelets in aggregates^{4,5}, and participation in an ecto-ATPase system⁶. It has been claimed that in muscle^{7,8} and mitochondria^{9,10} the rare earth metal ions interfere strongly with Ca binding and movements. We therefore investigated the effect of lanthanum ions on ADP-induced platelet aggregation.

Material and methods. Blood was drawn by venipuncture from healthy volunteers into citrate (0.11 M final concentration) or heparin (10 units/ml blood). Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of the blood at room temperature for 15 min at 180 × g. Platelet aggregation was measured as the fall in optical density (O.D.) in PRP at 37°C using an EEL platelet aggregation meter, model 169. ADP (sodium salt, from Sigma, St. Louis) was made up in 0.15 M NaCl (400 μM), kept frozen and diluted with 0.15 M NaCl to desired concentration before use. LaCl₃ (analytical grade) was made up in H₂O to a concentration of 132 mM, and was diluted to desired concentrations with 0.15 M NaCl.

Results and discussion. Unlike ions of the alkaline earth and transition group metals¹¹, La³⁺ did not cause platelet aggregation when added to either citrate or heparin PRP. In both heparin and citrate PRP platelet aggregation by ADP was markedly inhibited by La³⁺ in a concentration dependent manner (Figure). About 4 times as much La³⁺ was required to produce a given degree of inhibition with citrate as anticoagulant than with heparin. This most probably was caused by chelation of

¹ G. V. R. BORN and M. J. CROSS, *J. Physiol., Lond.* 170, 397 (1964).

² T. HOVIC, *Thromb. Diath. haemorrh.* 12, 179 (1964).

³ L. SKOZA, M. B. ZUCKER, Z. JERUSHALMY and R. GRANT, *Thromb. Diath. haemorrh.* 18, 713 (1967).

⁴ J. R. O'BRIEN, *J. clin. Path.* 14, 140 (1961).

⁵ A. GAARDER and S. LALAND, *Nature, Lond.* 202, 909 (1964).

⁶ D. A. CHAMBERS, E. W. SALZMAN and L. L. NERI, *Arch. Biochem. Biophys.* 119, 173 (1967).

⁷ G. B. WEISS and F. R. GOODMAN, *J. Pharm. exp. Ther.* 169, 46 (1969).

⁸ C. VAN BREEMEN and E. McNAUGHTON, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 39, 567 (1970).

⁹ L. MELA, *Biochemistry* 8, 2481 (1969).

¹⁰ L. MELA and B. CHANCE, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 35, 556 (1969).

¹¹ F. PENGLIS and F. MICHAL, *Experientia* 25, 745 (1969).