

## 169. Über die Wechselwirkungen von Polystyrolsulfonaten mit Eiweissen

von H. C. Isliker.

(11. III. 57.)

Synthetische Polyelektrolyte sind neuerdings zur Fraktionierung von Eiweissgemischen herangezogen worden. *Morawetz & Hughes<sup>1)</sup>* haben die Wechselwirkungen von Rinderserumalbumin mit Polymethacrylsäure, Maleinsäureanhydrid-Styrol-Copolymeren und Polyvinylamin untersucht. Es zeigte sich, dass innerhalb bestimmter Konzentrationen und pH-Grenzen Albumin vollständig ausgefällt wird und aus seinem Komplex mit dem Polyelektrolyten unverändert wieder abgetrennt werden kann. *Berdick & Morawetz<sup>2)</sup>* sowie *Wieland* und Mitarb.<sup>3)</sup> haben Polyacrylate mit Erfolg zur Fraktionierung von Eiweissgemischen verwendet. *Isliker & Strauss<sup>4)5)</sup>* gelang die Freisetzung eines Antikörpers aus seinem Komplex mit Antigen (PR8-Influenza-Virus) durch Polymethacrylat bei pH 5,5.

Im folgenden wollen wir zeigen, dass Polystyrolsulfonate (PSS) zur Fraktionierung von Eiweissgemischen herangezogen werden können, wobei wir gleichzeitig die Abhängigkeit der erwähnten Wechselwirkungen vom Molekulargewicht und von der Ladungsdichte des Polyelektrolyten verfolgen werden.

### Experimenteller Teil.

Gut charakterisierte Polystyrolsulfate wurden uns in verdankenswerter Weise von den Herren *Signer & Müller<sup>6)</sup>* zur Verfügung gestellt. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Präparate wurden an anderer Stelle beschrieben<sup>7)8)9)</sup>. Die Sulfonsäuren wurden durch Sulfonieren eines technischen Polystyrols (Trolitul: Molekulargewicht  $100000 \pm 20000$ ) mit variierenden Mengen der Anlagerungsverbindungen von Schwefeltrioxyd an Dioxan hergestellt<sup>8)9)</sup>. Die Sulfonsäuren wurden mit Hilfe einer Anionenaustauscherkolonne von Schwefelsäure befreit und durch Titration mit 0,1-n. Natronlauge in die Sulfone übergeführt. Aus der verwendeten Menge Lauge konnten Rückschlüsse auf

<sup>1)</sup> *H. Morawetz & W. L. Hughes*, J. physic. Chemistry **56**, 64 (1952).

<sup>2)</sup> *M. Berdick & H. Morawetz*, J. biol. Chemistry **206**, 959 (1954).

<sup>3)</sup> *T. Wieland, H. Goldmann, W. Kern, H. E. Schultze & H. D. Matheka*, Makromol. Chem. **10**, 136 (1953).

<sup>4)</sup> *H. C. Isliker & P. Strauss*, Federation Proc. **13**, 236 (1954).

<sup>5)</sup> *H. C. Isliker & P. Strauss*, in Vorbereitung.

<sup>6)</sup> *R. Signer & C. Müller*, Institut für allgemeine und spezielle organische Chemie, Bern.

<sup>7)</sup> *R. Signer & A. Demagistry*, J. Chim. phys. **47**, 704 (1950).

<sup>8)</sup> *C. Müller*, Herstellung und Eigenschaften löslicher Polystyrolsulfonsäuren, Diss. Bern 1955.

<sup>9)</sup> *R. Signer, A. Demagistry & C. Müller*, Makromol. Chem. **18/19**, 139 (1956).

den Sulfonierungsgrad ( $\sigma$ ) gemacht werden. Bei Angabe molarer Verhältnisse wurden den Berechnungen folgende Molekulargewichte zugrunde gelegt:

$$\begin{array}{ll} \sigma = 0,07: \text{Molekulargewicht } 109\,600 & \sigma = 0,79: \text{Molekulargewicht } 167\,200 \\ \sigma = 0,54: \text{Molekulargewicht } 147\,200 & \sigma = 0,98: \text{Molekulargewicht } 182\,000 \end{array}$$

Die Sulfonate mit  $\sigma \leq 0,54$  wurden in destilliertem Wasser zur gewünschten Konzentration aufgelöst. Das niedersulfonierte Präparat ( $\sigma = 0,07$ ) musste zunächst in einer Mischung gleicher Teile 1,2-Dichloräthan, Methanol, Dioxan, n-Propanol und Wasser aufgelöst werden. Die organischen Anteile wurden im Vakuum abdestilliert und gleichzeitig durch Zusatz von destilliertem Wasser ersetzt. Auf diese Weise konnten leicht rein wässrige 1-proz. Lösungen hergestellt werden<sup>8)</sup>.

Die  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  sind für alle Sulfonierungsgrade gleich und betragen bei  $280 \text{ m}\mu$  1,8, im alkalischen Gebiet 2,0. Bei  $262 \text{ m}\mu$  liegt ein scharfes Absorptionsmaximum vor ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 16,4$ , im alkalischen Gebiet 16,6), was die gleichzeitige Bestimmung von Eiweiss und Polyelektrolyt in Gemischen ermöglicht. Wo nichts anderes vermerkt, wurde ein Polystyrolsulfonat mit dem Sulfonierungsgrad  $\sigma = 0,54$  verwendet. Dies bedeutet, dass im Mittel etwas mehr als jeder zweite Phenylrest des Polystyrols sulfonierte ist.

Als Testobjekte dienten humanes  $\gamma$ -Globulin (HGG) und kristallisiertes bovinus Serumalbumin (BSA). Ersteres wurde vor allem im Hinblick auf eine mögliche Auftrennung der Antikörper eingehend geprüft.

**Humanes  $\gamma$ -Globulin:** Eine 16-proz. Lösung von HGG (hergestellt nach Cohn's Methoden 6 und 9) wurde kurz vor Gebrauch mit 0,05-m. NaCl auf 1% verdünnt. Die Konzentration wurde im Beckman-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von  $280 \text{ m}\mu$  bestimmt ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 16,0$ ). Bei pH-Werten über 10 liegt die  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  bei 15,0.

**Bovines Serumalbumin:** Kristallisiertes Rinderalbumin (*Armour*) wurde mit destilliertem Wasser zu einer 1-proz. Lösung angesetzt. Bei  $280 \text{ m}\mu$  und pH 7,1 beträgt die  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  5,6; bei pH-Werten über 10 liegt der entsprechende Wert bei 6,4.

Löslichkeitsbestimmungen der Eiweiss-Polyelektrolytkomplexe wurden spektrophotometrisch oder durch Stickstoffanalyse durchgeführt. Die berechneten Mengen Puffer und Polyelektrolyt wurden im Kältebad auf  $1^\circ$  vorgekühlt und mit konstanten Mengen Eiweiss versetzt. 1 Std. nach dem Mischen wurden die entstandenen Niederschläge in einer MSE-Zentrifuge bei  $0^\circ$  abgeschleudert und die überstehenden Lösungen dekantiert. In einem aliquoten Teil wurde das pH kontrolliert und die Eiweiss- und Polyelektrolytkonzentration aus den Extinktionswerten (E) bei  $262$  und  $280 \text{ m}\mu$  bestimmt. Zur Bestimmung des Albumins z. B. wurde die Formel:

$$\% \text{ BSA} = f (E_{280 \text{ m}\mu} \cdot a - E_{262 \text{ m}\mu} \cdot b) / (a - b)$$

abgeleitet, worin f ein Faktor ist, der den Verdünnungen Rechnung trägt; a ist das Verhältnis der Extinktionen von PSS bei  $262$  und  $280 \text{ m}\mu$ , b das entsprechende Verhältnis für Kinderserumalbumin. Zur Kontrolle wurden die Niederschläge sorgfältig dekantiert und in 0,1-n. Natronlauge gelöst; in diesen Lösungen wurden Eiweiss- und Polyelektrolytkonzentration nach der gleichen Methode mit den entsprechenden Formeln bestimmt. Stickstoffanalyse (nach *Kjeldahl*) der überstehenden Lösungen und der Rückstände bestätigten die spektrophotometrisch ermittelten Albuminwerte. Die Löslichkeit des  $\gamma$ -Globulins wurde analog derjenigen des Albumins bestimmt.

Wo ein Gemisch von  $\gamma$ -Globulin und Albumin vorlag, wurden Papierelektrophoresen nach *Durrum*<sup>10)</sup> vorgenommen und das Mengenverhältnis der Eiweisse densitometrisch bestimmt. Die Gegenwart von Polyelektrolyt hatte in den von uns verwendeten Mengen keinen Einfluss auf die Auswertung.

**1. System: Humanes  $\gamma$ -Globulin/Polystyrolsulfonat.** Einfluss der Ionenstärke und der Polyelektrolytkonzentration. Die Löslichkeit der Polyelektrolyt-Eiweisskomplexe ist stark von der Salz-

<sup>10)</sup> E. Durrum, J. Amer. chem. Soc. **72**, 2943 (1950).

konzentration abhängig. Bei Ionenstärke 0,275 und pH 6,5 gelingt selbst bei hoher Polystyrolsulfonatkonzentration nur eine teilweise Ausfällung von  $\gamma$ -Globulin. Bei Ionenstärke 0,037 beträgt die zur Ausfällung des Eiweisses benötigte Polystyrolsulfonatmenge 0,3 Mol pro Mol  $\gamma$ -Globulin. Das Molekulargewicht des verwendeten PSS liegt bei 150 000 und ist von derselben Grössenordnung wie das Molekulargewicht des  $\gamma$ -Globulins. Die Löslichkeit des  $\gamma$ -Globulins als Funktion

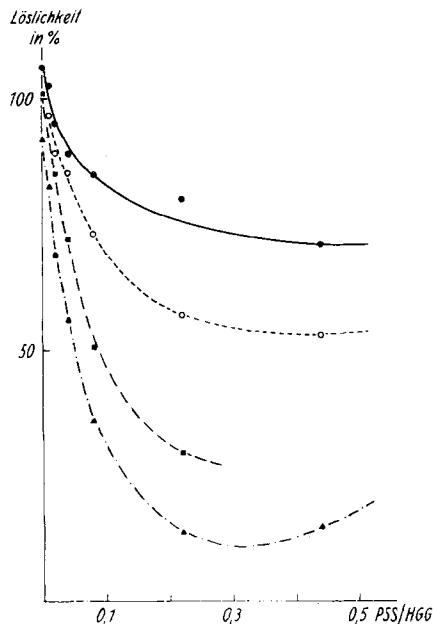


Fig. 1.

Löslichkeit von humanem  $\gamma$ -Globulin (HGG) als Funktion der Polystyrolsulfonat-Konzentration (PSS:  $\sigma = 0,54$ ). pH = 6,0. Ordinate: Löslichkeit; 100% entspricht 0,5% HGG. Abszisse: PSS/HGG; 0,5 entspricht 0,25% PSS.

Wirkung der Ionenstärke: 0,275 —○—  
0,175 -○---  
0,075 -●---  
0,0375 ▲—▲—

der Ionenstärke und der Polyelektrolytkonzentration ist in Fig. 1 aufgetragen. Der Niederschlag löst sich im Überschuss des Polyelektrolyten auf.

*Einfluss der Teilchengrösse des Polystyrolsulfonates.* Durch multiplikative fraktionierte Fällung mit Propanol und Wasser<sup>8)</sup><sup>11)</sup> wurden aus einem polydispersen Präparat ( $\sigma = 0,54$ ) eine niedermolekulare Fraktion mit einer Grenzviskositätszahl von 0,03 und eine hochmolekulare Fraktion mit einer Grenzviskositätszahl von 0,25 herge-

<sup>11)</sup> R. Signer, Kunststoffe-Plastics 3, Heft 2, 47 (1956).

stellt, die mit dem polydispersen Ausgangsmaterial verglichen wurden. Fig. 2 zeigt, dass das Molekulargewicht des Polystyrolsulfonates keinen merklichen Einfluss auf die Fällbarkeit des  $\gamma$ -Globulins ausübt.

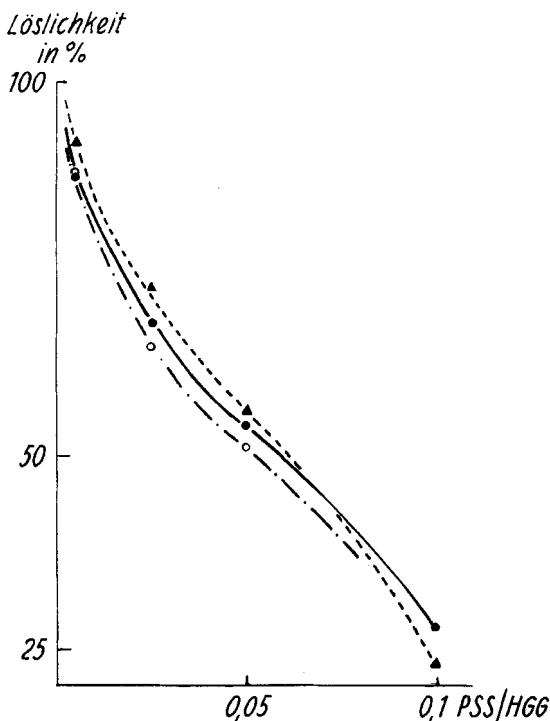


Fig. 2.

Löslichkeit des HGG als Funktion der PSS-Konzentration (wie Fig. 1). Wirkung der Teilchengröße des PSS ( $\sigma = 0,54$ ). pH = 6,0; Ionenstärke = 0,1.

- polydisperse PSS-Fraktion
- - - niedermolekulare PSS-Fraktion (Gelzetazahl = 0,03)
- · - hochmolekulare PSS-Fraktion (Gelzetazahl = 0,25)

*Der Einfluss des Sulfonierungsgrades* wurde mit Präparaten von 4 Sulfonierungsgraden untersucht ( $\sigma$ : 0,07, 0,54, 0,79 und 0,98), die bei pH 6,0 und Ionenstärke 0,05 in steigenden Mengen einer konstanten Menge  $\gamma$ -Globulin zugesetzt wurden (Fig. 3). Die Anteile  $\gamma$ -Globulin (HGG), die bei einem PSS/HGG-Gewichtsverhältnis von 0,1 (0,3 mg PSS, 3 mg HGG) ausgefällt werden, ergeben sich aus der folgenden Tab. I.

Das Fällungsvermögen des Polyelektrolyten geht somit seiner Ladungsdichte ungefähr proportional. In der letzten Spalte von Tab. I wurde die Zahl der Sulfonatgruppen berechnet, die benötigt werden, um eine Molekel  $\gamma$ -Globulin zu fällen. Bei den höheren Sulfonierungsgraden ergaben sich Werte um 95, was annähernd mit der Summe der kationischen Stickstoffatome im  $\gamma$ -Globulin (99) übereinstimmt. Bei

einem Sulfonierungsgrad von 0,07 genügten 80  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen zur Ausfällung einer Molekel  $\gamma$ -Globulin. Es ist anzunehmen, dass der hydrophobe niedersulfonierte Polyelektrolyt das  $\gamma$ -Globulin schon vor der vollständigen Absättigung der kationischen Gruppen mitreisst.

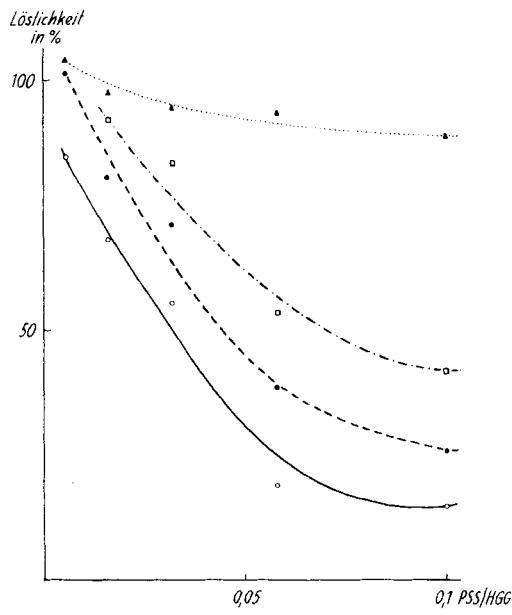


Fig. 3.

Löslichkeit von HGG als Funktion der PSS-Konzentration bei pH 6,0 und Ionenstärke 0,05.

Wirkung des Sulfonierungsgrades:  $\sigma = 0,07$  .....▲  
 $\sigma = 0,54$  .....□—□  
 $\sigma = 0,79$  .....●—●  
 $\sigma = 0,98$  .....○—○

**Tabelle I.**

Der Einfluss des Sulfonierungsgrades von Polystyrol auf die Löslichkeit von humanem  $\gamma$ -Globulin.

PSS $\sigma$	PSS ( $\mu\text{M}$ )	$\text{SO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ )	HGG im Niederschlag ( $\mu\text{M}$ )	$\text{SO}_3^-/\text{HGG}$ (in Molen)
0,07	$2,74 \cdot 10^{-3}$	0,192	$0,24 \cdot 10^{-2}$	80
0,54	$2,04 \cdot 10^{-3}$	1,10	$1,14 \cdot 10^{-2}$	96,5
0,79	$1,79 \cdot 10^{-3}$	1,415	$1,5 \cdot 10^{-2}$	94,3
0,98	$1,64 \cdot 10^{-3}$	1,6	$1,7 \cdot 10^{-2}$	96,5

Dieser Effekt lässt sich in eindrucksvoller Weise bei höherer Salzkonzentrationen demonstrieren: bei Ionenstärken über 0,3 fällt das niedersulfonierte PSS ( $\sigma = 0,07$ ) bedeutend mehr  $\gamma$ -Globulin aus als die hochsulfonierten Präparate. Es findet also geradezu eine Umkehr

des bei tiefen Ionenstärken beobachteten Effektes statt. Die niedersulfonierte Polystyrolsulfonate werden leicht ausgesalzt und adsorbieren erhebliche Mengen Eiweiss an ihrer Oberfläche.

Die obigen Versuche bestätigen, dass das wichtigste Moment bei der gegenseitigen Ausfällung von Kolloiden die Ladungsdichte ist. Die Löslichkeit der einzelnen Reaktionspartner spielt eine wesentliche, aber derjenigen der Ladungsdichte untergeordnete Rolle. Das Molekulargewicht hat innerhalb der von uns untersuchten Grenzen keinen Einfluss auf die Löslichkeit der Kolloidkomplexe.

*Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration.* Zunächst wurde bei konstanter PSS-Konzentration (PSS/HGG-Verhältnis = 0,05) das pH zwischen 4 und 8 variiert. Bei einem Sulfonierungsgrad 0,07 des PSS ergab sich so ein Löslichkeitsminimum um pH 6,2. Wird nun die

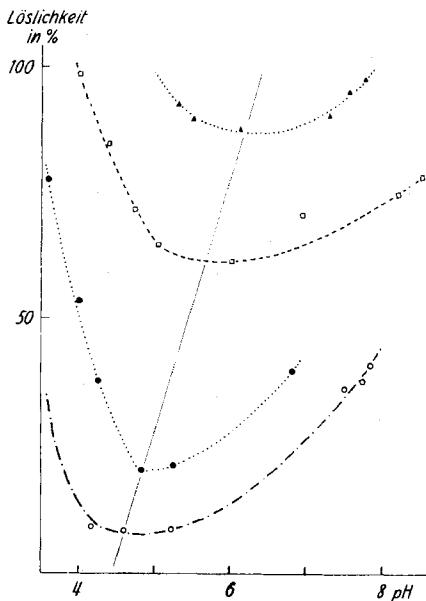


Fig. 4.

Löslichkeit von HGG in Gegenwart von PSS als Funktion des pH.

- a) Wirkung des Sulfonierungsgrades:  $\sigma = 0,07$        $\sigma = 0,54$        $\sigma = 0,98$       PSS = 0,025%      PSS = 0,25%
- b) Wirkung der PSS-Konzentration:  $\sigma = 0,07$       PSS = 0,025%       $\sigma = 0,54$       PSS = 0,25%

PSS-Menge auf das 10fache gesteigert, so verschiebt sich das Löslichkeitsminimum gegen pH 4,8. Die Löslichkeit des  $\gamma$ -Globulins wird dabei von 88 % auf 21 % vermindert (Fig. 4). Wird das PSS/HGG-Verhältnis konstant gehalten (0,05) und statt dessen der Sulfonierungsgrad des PSS erhöht, so verschiebt sich das Löslichkeitsminimum in der gleichen Richtung wie bei einer Steigerung der PSS-Konzentra-

tion. Alle Löslichkeitsminima liegen dabei auf einer Geraden in Funktion des pH. Die Untersuchung der überstehenden Lösungen beim Löslichkeitsminimum ergab, dass PSS quantitativ an den Niederschlag gebunden ist. Mit Zunahme der Zahl der eingefügten Sulfogruppen nimmt deshalb die negative Ladung des HGG-PSS-Komplexes zu, was die Verschiebung des Löslichkeitsminimums nach niedrigeren pH-Werten erklärt. In Abwesenheit von PSS liegt der isoelektrische Punkt des  $\gamma$ -Globulins bei pH 7.

Aus Fig. 4 geht hervor, dass die Löslichkeit des  $\gamma$ -Globulins bei allen pH-Werten mit zunehmender Ladungsdichte des Polyelektronen abnimmt.

Tab. II zeigt, dass bei pH 7 eine Zunahme des Sulfonierungsgrades um das 14fache einer Vermehrung des gefällten  $\gamma$ -Globulins auf den 7,3fachen Wert entspricht. Einer Konzentrationszunahme des PSS auf das 10fache entspricht bei gleichbleibendem Sulfonierungsgrad einer Vermehrung des gefällten  $\gamma$ -Globulins auf das 5,5fache. Auch aus diesen Messungen geht hervor, dass die Ausfällung des Eiweisses im wesentlichen von der absoluten Anzahl der Sulfogruppen abhängt.

**Tabelle II.**  
Versuche bei pH 7.

Nr.	PSS $\sigma$	PSS/HGG	% HGG gefällt	Zunahme bezogen auf Versuch 1		
				PSS $\sigma$	PSS/HGG	HGG gefällt
1	0,07	0,05	10	—	—	—
2	0,98	0,05	73	14×	—	7,3×
3	0,07	0,5	55	—	10×	5,5×

2. System: Bovines Serumalbumin/Polystyrolsulfonat. Bovines Serumalbumin (BSA) wird oberhalb pH 6 auch durch hohe PSS-Konzentrationen nicht gefällt. Bei pH 5,5 (PSS/BSA-Verhältnis = 0,5) sinkt die Löslichkeit sprunghaft auf unter 10% des Anfangswertes. Der gebildete Niederschlag löst sich bei pH 6 wieder auf. In Säure geht der Niederschlag erst bei extrem tiefen pH-Werten in Lösung. Die pH-Abhängigkeit der Löslichkeit von BSA ist in Fig. 5 wiedergegeben.

*Modifiziertes Serumalbumin.* Bovines Serumalbumin enthält 145 kationische Stickstoffatome, die z. T. befähigt sind, Anionen zu binden<sup>12)</sup>. Es wurde geprüft, ob durch Blockierung der Aminogruppen eine pH-Verschiebung der Ausfällung des modifizierten BSA durch PSS eintritt. BSA wurde teils mit Essigsäureanhydrid acetyliert<sup>13)</sup>, teils mit 10-proz. Formalin behandelt. Beide modifizierten BSA wur-

<sup>12)</sup> I. M. Klotz & J. M. Urquhart, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1597 (1949).

<sup>13)</sup> H. Fraenkel-Conrat in Greenberg, Amino Acids and Proteins, C. C. Thomas Springfield, Illinois 1951, S. 547.

den gegen Puffer dialysiert, dann wurden ihre Löslichkeiten in Gegenwart von PSS als Funktion des pH bestimmt: das acetylierte BSA fiel erst unterhalb pH 4,8 aus, das mit Formalin behandelte BSA bei pH 5. Auf Grund dieses Befundes erscheint es gerechtfertigt, in erster Linie die Aminogruppen für die Komplexbildung mit PSS verantwortlich zu machen. In Gegenwart von 0,05-m. KCNS wurde die Fällung von BSA in gleicher Weise verschoben wie im Fall der Formalinbehandlung. *Scatchard* und Mitarb.<sup>14)</sup> haben gezeigt, dass Thiocyanationen

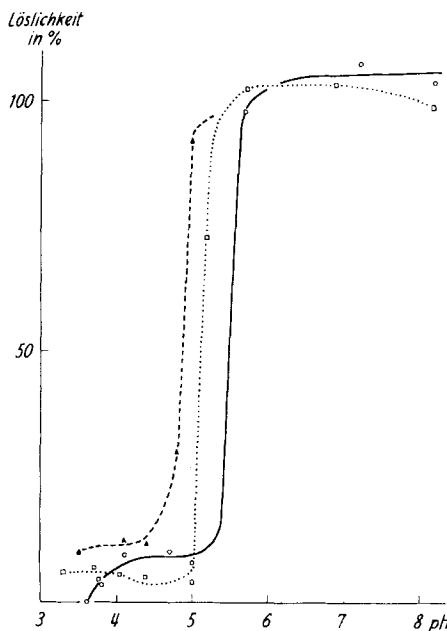


Fig. 5.

Löslichkeit von bovinem Serumalbumin (BSA) in Gegenwart von PSS (0,25%)  
als Funktion des pH.

- natives BSA
- acetyliertes BSA
- ...△... Mit Formalin behandeltes BSA (verhält sich gleich wie in Gegenwart von 0,05-m. KCNS gefälltes natives BSA).

signifikant von den Aminogruppen des Serumalbumins gebunden werden.

Variationen des Sulfonierungsgrades des Polyelektrolyten führten bei der Fällung des Serumalbumins zu den gleichen Effekten wie beim  $\gamma$ -Globulin.

Die Versuche zeigen, dass die Ausfällung der untersuchten Serumproteine in verschiedenen, klar umgrenzten pH-Bereichen stattfindet. Es wurde deshalb versucht, ein Gemisch von bovinem

<sup>14)</sup> G. Scatchard, I. H. Scheinberg & S. H. Armstrong, J. Amer. chem. Soc. **72**, 540 (1950).

Serumalbumin und humanem  $\gamma$ -Globulin mit dem Polyelektrylyten zu zerlegen.

3. System: Bovines Serumalbumin/humanes  $\gamma$ -Globulin/Polystyrolsulfonat. Gemische, enthaltend je 3% BSA und HGG, wurden bei verschiedenen pH-Werten mit PSS ( $\sigma = 0,54$ ) versetzt (Verhältnis PSS zu Eiweiss: 0,1). Nach Abzentrifugieren wurden die überstehenden Lösungen durch Stickstoffbestimmung sowie spektroskopische und papierelektrophoretische Analyse untersucht (Fig. 6). Bis zu pH 3,25 wurde BSA quantitativ und rein, ohne Mitreissen von HGG, gefällt. Zwischen pH 3,3 und 5,1 wurden Gemische von BSA und HGG in wechselnden Mengen gefällt. Oberhalb pH 5,2 war der gebildete Niederschlag albuminfrei. Beim Auflösen in Veronalpuffer pH 8,9 liess sich elektrophoretisch reines  $\gamma$ -Globulin mit einer Ausbeute von 65% nachweisen. Die Aufarbeitung des  $\gamma$ -Globulins erfolgte durch Ausfällen des PSS mit Bariumacetat. Das unlösliche Bariumpolystyrolsulfonat enthielt noch eingeschlossenes Eiweiss, das durch Umfällen in Lösung gebracht werden konnte.

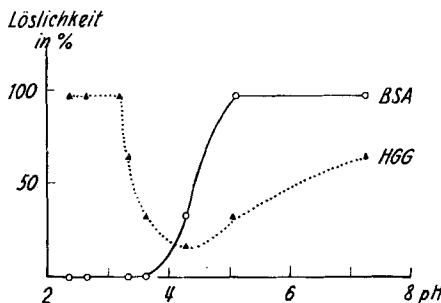


Fig. 6.

Löslichkeit von BSA (Anfangskonzentration 3%) und HGG (Anfangskonzentration 3%), die als Gemisch vorliegen, in Gegenwart von 0,3% PSS ( $\sigma = 0,54$ ). Wirkung des pH.

Zur Abtrennung des Globulins hat es sich bewährt, zunächst die Ausfällung des Albumins im sauren Gebiet vorzunehmen. Es muss indessen Sorge getragen werden, dass das pH nur wenige Minuten auf 3,2 belassen wird, indem die überstehende  $\gamma$ -Globulinlösung unmittelbar nach dem Zentrifugieren mit verdünnter Lauge zurücktitriert wird. Die Methode hat den Nachteil, dass das Polystyrolsulfonat mit dem Eiweiss Komplexe bildet, die rasch „altern“ und bei pH 8 nicht mehr in Lösung gebracht werden können. Das Gleichgewicht ist indessen nach der Fällung praktisch momentan erreicht, so dass die Niederschläge sofort zentrifugiert und wieder aufgelöst werden können.

*Die Reindarstellung von Antikörpern.* Die beschriebene Technik hat für die spezifische Reinigung von Antikörpern<sup>4)</sup><sup>5)</sup> praktische Bedeutung erlangt: ein im Kaninchen gegen BSA erzeugter Antikörper kann aus dem Immunserum durch Zusatz von BSA am Äquivalenz-

punkt gefällt werden. Der sorgfältig gewaschene Niederschlag löst sich in 0,05-n. Essigsäure auf. Zusatz von PSS fällt das Albumin quantitativ aus. Aus der überstehenden Lösung kann nach dem im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Verfahren elektrophoretisch reines  $\gamma$ -Globulin in guter Ausbeute (75 %) isoliert werden.

Im Bestreben, extrem tiefe pH-Werte zu vermeiden, wurde der Antigen-Antikörper-Komplex bei schwach alkalischem pH in Gegenwart von PSS gelöst. Zutropfen von Essigsäure führte bei pH 6 zu einer Ausfällung, die sich nach Auflösen bei pH 8,6 elektrophoretisch als  $\gamma$ -Globulin verhielt. Nach diesem Verfahren konnte nur 20–25 % der im Ausgangsmaterial vorliegenden Antikörper-Aktivität wieder gewonnen werden.

### Diskussion.

Polystyrolsulfonate sind zur Fraktionierung von Eiweissgemischen geeignet. Innerhalb scharf definierter pH-Grenzen können gewisse Eiweissgruppen von andern durch Fällung abgetrennt werden. Maximale Niederschlagsbildung tritt im allgemeinen dann ein, wenn die positive Überschussladung des Eiweißes (kationische Stickstoffgruppen) der negativen Ladung des Polyelektrolyten entspricht. Beim  $\gamma$ -Globulin werden diese Bedingungen um pH 6 erfüllt, beim Albumin um pH 4,8. Eine bestimmte Zunahme der negativen  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen kann sowohl durch Steigerung der Polyelektrolytkonzentration wie durch Verwendung der gleichen Menge eines höhersulfonierten Polystyrols erreicht werden. Die Löslichkeitsabnahme des Eiweißes ist bei gleicher Zunahme der Konzentration der  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen in den beiden Fällen von derselben Größenordnung.

An Hand von Lichtstreuungsversuchen konnte festgestellt werden, dass Komplexbildung zwischen Rinderserumalbumin und Polystyrolsulfonat schon zwischen pH 6 und 7 eintritt<sup>15)</sup>. Bei diesem pH kann von blossem Auge nicht die Spur einer Trübung festgestellt werden.

Da gleiche Gewichtsmengen hoch- und niedermolekularer Polystyrolsulfonate im Mittel gleichviel  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen enthalten, spielt das Molekulargewicht bei der Fällung von Eiweißen keine entscheidende Rolle. Es ist jedoch zu erwarten, dass sehr niedermolekulare Polystyrolsulfonate (die uns nicht zur Verfügung standen) keine oder nur schwache eiweissfällende Eigenschaften aufweisen.

Für präparative Arbeiten ist die Reversibilität der Komplexbildung zwischen Eiweiß und Polyelektrolyt von Wichtigkeit. Es ergab sich, dass ein bei pH 5 erzeugter PSS-Albuminniederschlag ohne weiteres bei pH 7,5 wieder in Lösung geht und mit Bariumacetat zerlegt werden kann. Wird der PSS-Albuminniederschlag aber – selbst

<sup>15)</sup> R. Weber, unveröffentlicht.

bei  $+1^{\circ}$  – länger als 1 Std. stehengelassen und erst dann mit Puffer auf pH 7,5 gebracht, so löst er sich nur noch unvollständig auf. Das Altern erfolgt schneller bei Temperaturen über  $1^{\circ}$  und ist bei niederen Sulfonierungsgraden des Polystyrols besonders ausgeprägt. Aus diesem Grund wurden alle Löslichkeitsbestimmungen bei  $+1^{\circ}$  vorgenommen. Beim präparativen Arbeiten wurden die Niederschläge unmittelbar nach ihrer Bildung aufgelöst. Die Niederschlagsmenge wird durch längeres Stehen nicht vermehrt. Komplexe von Eiweissen mit Polymethacrylat altern ähnlich, doch in geringerem Masse als die Polystyrolsulfonatkomplexe<sup>5)</sup>. Ein Altern von Niederschlägen findet sich auch bei Antigen-Antikörper-Komplexen<sup>16)</sup><sup>17)</sup>. Die letzteren können nach längerem Lagern nur schwer in die Einzelkomponenten zerlegt werden.

Antigen-Antikörper-Komplexe verhalten sich auch in anderer Hinsicht ähnlich wie Eiweiss-Polyelektrolyt-Komplexe. In den beiden Systemen ist der Komplex im Überschuss der einzelnen Reaktionspartner löslich. Es lag deshalb nahe, Antikörper aus spezifischen Präzipitaten mit Polyelektrolyten zu verdrängen: zu diesem Zweck wird der bei pH 9 gelöste Antigen-Antikörper-Komplex mit verdünnter Säure auf einen pH-Wert eingestellt, der zwischen den isoelektrischen Punkten des Antikörpers ( $\gamma$ -Globulin: 7,0) und des Antigens liegt. Bei pH 6,0 z. B. haben die meisten Antigene noch eine negative Überschussladung und beibehalten in Gegenwart von PSS in Lösung. Das positiv geladene  $\gamma$ -Globulin hingegen wird durch den Polyelektrolyten gefällt. Dies ist die einzige Methode, die es erlaubt, Antikörper zu Proteinantigenen im interisoelektrischen Bereich von einem spezifischen Präzipitat abzutrennen. Proteinantigen-Antikörper-Komplexe lassen sich sonst nur durch starke Säure oder Lauge dissoziieren. Die relativ niedrigen Ausbeuten an aktivem Antikörper deuten auf eine Inaktivierung durch die Einwirkung des Polystyrolsulfonates. In dieser Hinsicht erscheint die Anwendung löslicher Polymethacrylate schonender<sup>4)</sup>.

Um die Selektivität der Komplexbildung zu prüfen, wurde versucht, Antikörper ohne Zuhilfenahme eines Antigens direkt mit PSS anzureichern. Die Benutzung von Polyelektrolyten bietet aber gegenüber den bisher verwendeten Verfahren, wie Ammoniumsulfat- und Zinksalzfällung<sup>18)</sup>, keine wesentlichen Vorteile. Einzelheiten über die Anwendung von Polystyrolsulfonat in der Immunologie und auf Probleme des Properdinsystems werden in einer späteren Arbeit beschrieben.

Diese Arbeit wurde ermöglicht durch eine Zuwendung des *Schweiz. Nationalfonds* im Rahmen eines Proteinforschungsprojektes an der Universität Bern.

<sup>16)</sup> D. Campbell & E. Lüscher, persönliche Mitteilung.

<sup>17)</sup> H. C. Isliker, Ann. N. Y. Acad. Sci. **57**, 225 (1953).

<sup>18)</sup> H. C. Isliker & H. N. Antoniades, J. Amer. chem. Soc. **77**, 5863 (1955).

Herrn Prof. Dr. R. Signer möchte ich für die zahlreichen wertvollen Ratschläge meinen besten Dank aussprechen. Herrn Dr. C. Müller sei für die Überlassung der Polystyrolsulfonate, Fräulein G. Lehmann und Fräulein E. Kaufmann für die Durchführung der Analysen gedankt.

#### SUMMARY.

Polystyrene sulfonates can be used for the fractionation of protein mixtures. Under optimal conditions 1 mole of polyelectrolyte will precipitate 10 moles of human  $\gamma$ -globulin. With bovine serum albumin no precipitation occurs under the same conditions. This provides a basis for the separation of  $\gamma$ -globulin from serum albumin.

The solubility of the polystyrene sulfonate-protein complexes was studied as a function of ionic strength, pH and the ratio of polyelectrolyte to protein. The characteristics of the solubility curves are similar to those of curves obtained with two proteins of very different isoelectric points. The complexes are soluble in the excess of either component, thus resembling the specific precipitates formed in certain antigen-antibody systems.

By testing polystyrenes with different degrees of sulfonation it was shown that the ratio of the sulfonate groups on the polyelectrolyte to the cationic groups on the protein is the essential factor determining the solubility of a complex. The molecular weight and the solubility of the single component are of secondary importance.

The application of polyelectrolytes to protein fractionation in general and to antibody purification in special is discussed.

Medizinisch-chemisches Institut und  
Theodor-Kocher-Institut der Universität Bern.

## 170. De l'action d'aldéhydes sur le chlorure de benzylmagnésium et quelques homologues

par A. Jacot-Guillarmod.

(27 IV 57.)

Plusieurs travaux ont montré les particularités réactionnelles du chlorure de benzylmagnésium avec différents composés organiques<sup>1)</sup> et en particulier avec les aldéhydes. Parmi ces derniers, le formaldéhyde conduit à la formation d'alcool o-tolue au lieu de benzylcarbinol<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> H. Gilman & J. E. Kirby, J. Amer. chem. Soc. **54**, 352 (1932); P. R. Austin & J. R. Johnson, *ibid.* **54**, 655 (1932).

<sup>2)</sup> V. Grignard, Bull. Soc. chim. France [2] **29**, 953 (1903).