rückzuführen ist. Die hierüber angestellten Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

Der Osram-Studiengesellschaft, Berlin, danken wir für die uns zur Verfügung gestellte HNS 12 und das UV-Normal.

Besonderer Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit.

Anm. b. d. Korr.: In der Zwischenzeit erhielten wir eine weitere Arbeit⁹, die sich mit der Latenzzeit-Verlängerung

uv-bestrahlter TI-Phagen befaßt. Die Bestrahlung der Phagen wurde von SETLOW und Mitarbb. mit vakuumgetrocknetem Material bei Zimmertemperatur und der Temperatur von flüssiger Luft durchgeführt. Es wird die Verlängerung der Latenzzeit als dosisproportional beschrieben (vgl. ECKART⁸) sowie über eine Photoreaktivierung und das Wirkungsspektrum dieser Schädigung berichtet. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den eigenen Befunden wird dadurch erschwert, daß eine andere Versuchsmethodik und eine andere Definition der Latenzzeit verwendet wird.

⁹ R. SETLOW, S. ROBBINS u. E. POLARD, *Radiation Res.* **2**, 262 [1955].

Trichloressigsäure-Aceton-Extraktion von Albuminen aus Seren und Antigen-Antikörper-Präzipitaten

VON EKKEHARD KALLEE, FRIEDRICH LOHSS und WILLMAR OPPERMANN*

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. BENNHOLD)

(Z. Naturforsch. **12 b**, 777—783 [1957]; eingegangen am 20. August 1957)

1. Highly purified albumin fractions can be obtained by precipitating human, rabbit, or rat sera with trichloroacetic acid, and extracting the precipitates with acetone.

2. Human albumin thus prepared is identical with the original albumin in its electrophoretic properties, its dye-binding ability, and in its immunological behavior.

3. After precipitating human albumin with antibodies the albumin antigen can be extracted in a good yield by use of trichloroacetic acid and acetone without losing the electrophoretic or antigenic characteristics of albumin.

Trichloressigsäure (= TCA) wird seit langem zur routinemäßigen Enteiweißung von proteinhaltigen Lösungen verwendet. Man hatte bisher allgemein angenommen, daß die TCA-Fällung aller Proteine — ausgenommen Insulin¹ — eine irreversible Denaturierung darstelle. Um so bemerkenswerter erschien uns daher eine Mitteilung von SCHWERT², der Rinderalbumin mit TCA gefällt und das Präzipitat in Aceton (= Ac) gelöst hatte; nach der Dialyse dieser TCA — Ac-Albuminlösungen konnte er in hoher Ausbeute ein Rinderalbumin erhalten, das in seiner Sedimentationskonstante, elektrophoretischen Beweglichkeit, Löslichkeit und Kristallisierbarkeit mit dem unbehandelten Albumin identisch war. In Anbetracht der praktischen Bedeutung dieser Befunde schien es uns wichtig zu prüfen, ob diese überaus einfache Methode allgemein zur Reindarstellung von Serum-Albuminen dienen könnte. Wir unternahmen deshalb Versuche zur Extraktion von Albumin aus den TCA-Präzipitaten von Human-, Kaninchen- und Rattenserum. Die gewonnenen Albuminfraktionen wurden papierelektrophoretisch untersucht; ferner

verglichen wir das Farbstoff-Bindungsvermögen von Human-Serum-Albumin (HSA) mit TCA — HSA. Schließlich führten wir immunbiologische Versuche mit HSA und TCA-Albumin durch, teilweise unter Verwendung von ¹³¹I — HSA. Es zeigte sich, daß die TCA — Ac-Extraktionsmethode offenbar ganz allgemein dazu geeignet ist, Albumine von Globulinen zu trennen, nicht nur aus verschiedenen Seren, sondern auch aus Immunpräzipitaten.

V Versuchsergebnisse

I. TCA-Albumin-Extrakte aus Seren

1. Mischelektrophoresen von dialysiertem TCA — Ac — HSA mit dem als Ausgangsmaterial dienenden HSA (Behringwerke) ergaben keinen Anhaltspunkt für eine Änderung der papierelektrophoretischen Beweglichkeit des TCA — Ac — HSA. Dialysierte TCA — Ac-Extrakte aus Human-Mischserum lieferten praktisch globulinfreies HSA (Abb. 1). Die auf dem Elektrophorese-Streifen (B) erkennbare Anfärbung im Globulinbereich ist nicht durch Globulin-Verun-

* Ass.-Arzt am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart (Chefarzt: Doz. Dr. G. SEYBOLD), derzeit Gastarzt im Isotopenlabor der Med. Klinik Tübingen.

¹ C. BOMSKOV, „Methodik der Hormonforschung“, Vol. I, 673, G. Thieme Verlag, Leipzig 1937.

² G. W. SCHWERT, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 139 [1957].

reinigungen verursacht, sondern durch eine Adsorption von Albumin an das Filtrierpapier³; jedenfalls sind keine Banden erkennbar, die irgendeinem Globulin entsprechen könnten.

Abb. 1. Papierelektrophorese von Humanmischserum vor und nach TCA-Behandlung und anschließender Extraktion. A: 0,008 cm³ Humanmischserum vor TCA-Behandlung, 6,8 g-% Protein enthaltend. B: 0,01 cm³ TCA—Ac-Extrakt des gleichen Serums, 2,5 g-% Protein enthaltend. C: 0,01 cm³ TCA—NaHCO₃-Extrakt des gleichen Serums, 3,3 g-% Protein enthaltend. Auf dem Streifen B läßt sich außer Albumin keine weitere Serumprotein-Fraktion erkennen, auf dem Streifen C sind β - und α_1 -Globuline deutlich zu sehen, α_2 -Globulin nur angedeutet. Die unterschiedliche Wanderstrecke hat nichts mit einer Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Albumine zu tun, was durch Abb. 5 bewiesen wird. Whatman I-Papier; Elphor (Bender & Hobein, München); 110 V; pH 8,5; Veronal-Na-acetat-Puffer; $\mu=0,1$; Amidodschwarz 10 B. $\downarrow$ =Auftragestellen, +=Anode, -=Kathode.

TCA—Ac-Extrakte aus Kaninchen- bzw. Rattenserum lieferten ebenfalls praktisch globulinfreie Albumine (Abb. 2).

2. Aus TCA-Präzipitaten von Humanserum läßt sich nicht nur mit organischen Lösungsmitteln wie Ac² oder Alkoholen^{2, 4-6} HSA extrahieren, vielmehr genügt hierfür auch eine Neutralisation der TCA mit NaHCO₃. Allerdings sind solche NaHCO₃-Extrakte lediglich frei von γ -Globulinen, während — im Gegensatz zur Ac-Extraktion — β - und α -Globuline noch in deutlich nachweisbaren Mengen mit in Lösung gehen (Abb. 1, C). Dieser Befund zeigt, daß durch eine Fällung mit 5-proz. TCA selbst die empfindlicheren α - und β -Globuline nicht vollständig denaturiert werden.

Mit 5-proz. neutralem TCA-Na konnte aus Humanmischserum kein Protein gefällt werden. Daraus ist abzuleiten, daß das Trichloracetat-Ion allein keine γ -Globuline fällt; vielmehr ist für die Denaturierung von γ -Globulinen durch TCA ein niedriger pH -Wert erforderlich.

Abb. 2. Gewinnung von Kaninchen- und Rattensalbumin durch TCA—Ac-Extraktion. A: 0,008 cm³ Kaninchen-Mischserum, vor TCA—Ac-Extraktion, 6,6 g-% Protein enthaltend. B: 0,01 cm³ TCA—Ac-Extrakt des gleichen Serums, 3 g-% Protein enthaltend. C: 0,008 cm³ Rattenserum, vor TCA-Extraktion, 8,0 g-% Protein enthaltend. D: 0,01 cm³ TCA—Ac-Extrakt des gleichen Serums, ca. 4 g-% Protein enthaltend. Außer Albumin sind keine Globulinspuren zu erkennen. Die mit dem Albumin von Streifen C fast identische Wanderstrecke des TCA-Albumins auf diesem Streifen ist zufallsbedingt.

3. Die Albumin-Ausbeuten, berechnet auf die dialysierten TCA—Ac-Extrakte vor der Pervaporation, sind überraschend hoch. Nach einmaliger TCA—Ac-Extraktion von HSA aus Mischserum betrug die Ausbeute ca. 71% des eingesetzten Albumins; die entsprechenden Werte bei Kaninchen- bzw. Rattenserum waren ca. 68% bzw. 72%, lagen also durchschnittlich um 70 Prozent. (In späteren Versuchen betrugen die Ausbeuten bei Humanserum ca. 76 und 90%, bei Kaninchenserum ca. 100%, bei Rattenserum ca. 80 und 100%.)

Noch höher war die HSA-Ausbeute nach der Neutralisierung der TCA mit NaHCO₃, nämlich 95%, was praktisch einer quantitativen Wiedergewinnung entspricht; jedoch findet man bei diesem Neutralisationsverfahren neben Albumin noch etwa 15% α - und β -Globulin-Verunreinigungen (Tab. 1).

³ H. BENNHOLD, E. KALLEE u. E. ROTH, Z. Naturforschg. **7** b, 324 [1952].

⁴ S. LEVINE, Arch. Biochem. Biophysics **50**, 515 [1954].

⁵ M. DELAVILLE, G. DELAVILLE u. J. DELAVILLE, Ann. pharmac. franc. **12**, 109 [1954], zit. n. SCHWERT².

⁶ A. KORNER u. J. R. DEBRO, Nature [London] **178**, 1067 [1956].

Art des Serums	Fraktion	mg Eiweiß vor Extraktion	in % der Gesamtproteine vor der Fällung	mg Eiweiß nach Extraktion	in % der Gesamtproteine nach der Fällung	Ausbeute in % der Fraktion	Extraktionsmittel
Human-Mischserum	Gesamtproteine	684	100	268	100	39	Aceton
	Albumin	309	45,1	220	82	71	
	α_1 -Glob.	40	5,8	ca. 0	ca. 0	ca. 0	
	α_2 -Glob.	63	9,2	0	0	0	
	β -Glob.	108	15,8	0	0	0	
	γ -Glob.	165	24,2	0	0	0	
dto.	Gesamtproteine	684	100	355	100	52	NaHCO ₃
	Albumin	309	45,1	296	83	95	
	α_1 -Glob.	40	5,8	15	ca. 4	37	
	α_2 -Glob.	63	9,2	9	ca. 2,5	14	
	β -Glob.	108	15,8	28	8	26	
	γ -Glob.	165	24,2	0	0	0	
Kaninchen-Mischserum	Gesamtproteine	665	100	267	100	40	Aceton
	Albumin	354	53,3	240	90	68	
	α -Glob.	102	15,3	ca. 0	ca. 0	ca. 0	
	β -Glob.	93	14,0	0	0	0	
	γ -Glob.	116	17,5	0	0	0	
Ratten-serum	Gesamtproteine	159	100	52	100	33	Aceton
	Albumin	64	41,2	46	88,5	72	
	α_1 -Glob.	27	17	ca. 0	ca. 0	ca. 0	
	α_2 -Glob.	8	5,4	0	0	0	
	β -Glob.	29	17,4	0	0	0	
	γ -Glob.	31	18,6	0	0	0	

Tab. 1. Ausbeuten an Proteinfractionen bei TCA-Fällungen von verschiedenen Blutseren und nachfolgender Extraktion. „ca. 0“ bedeutet, daß durch die adsorptive Schwanzbildung der Albumine etwaige Globulinspuren verschleiert bleiben können.

4. Versuche, auch noch andere Proteine durch TCA-Fällung und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln zu gewinnen oder wenigstens zu reinigen, schlugen fehl. Weder ein farbstoffbindendes Protein mit β -Globulinbeweglichkeit aus wäßrigen Extrakten von Mitochondrien⁷ noch ein solches aus flüssigem Cytoplasma von Rattenlebern⁸ konnte mit TCA – Ac, TCA – Äthanol bzw. TCA – NaHCO₃ gewonnen werden. Auch Bence-Jones-Protein blieb unlöslich.

II. Farbstoffbindung von TCA – HSA

Da schon lange bekannt ist, daß gereinigte HSA-Präparate ein geringeres Farbstoff-Bindungsvermögen besitzen als natives HSA⁹, und daß Serum-

Albumine ihre Farbstoff-Bindungsfähigkeit bei enzymatischer Verdauung verlieren¹⁰, versuchten wir mit Gleichgewichtsdialysen festzustellen, ob TCA – HSA seine Bindungsfähigkeit für Bromphenolblau im Vergleich zum Original-HSA ändert. Wir benutzten dafür teilweise die klassische Gleichgewichtsdialyse^{11, 12a} gegen Pufferlösungen. Für einige andere Versuche wandten wir aber auch ein neues Verfahren an, bei dem die Flüssigkeiten außerhalb und innerhalb der Dialysemembran dieselben Protein- und Farbstoffkonzentrationen enthalten⁸; ist die Farbstoff-Bindungsfähigkeit des Proteins auf der einen Seite der Membran größer als die des Proteins auf der anderen Seite, so muß das stärker bindende Protein infolge der Konkurrenzadsorption

⁷ E. KALLEE, Arch. Biochem. Biophysics **60**, 265 [1956].

⁸ W. OPPERMAN u. E. KALLEE, in Vorbereitung.

⁹ H. BENNHOLD, H. OTT u. E. KALLEE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **287**, 185 [1951].

¹⁰ T. KUSUNOKI u. H. KIMURA, J. Biochemistry [Tokyo] **42**, 111 [1955].

¹¹ I. M. KLOTZ, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **14**, 97 [1949] (Übersichtsreferat).

^{12a} W. OPPERMAN u. H. OTT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **308**, 43 [1957].

mehr Farbstoff aufnehmen als das schwächer bindende Protein. In einem solchen Falle müßte das Verhältnis der Farbstoffkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Membran ($R_{i/a}$) größer oder kleiner als 1,0 werden.

Bei der „klassischen“ Dialysemethode lagen die Unterschiede zwischen HSA und TCA-HSA innerhalb der Fehlerbreite (Tab. 2). Auch in den „Konkurrenz“-Dialysen war die Bindungsfähigkeit des TCA-HSA nicht erniedrigt, eher erhöht; trotz einer statistischen Signifikanz von $5 \sigma_{\text{Diff.}}$ möchten wir aus dem geringen Unterschied (7%) keinen verbindlichen Schluß ziehen (Tab. 3). Es wäre allerdings denkbar, daß die Bindungsfähigkeit von TCA-HSA gegenüber anionischen Farbstoffen durch solche Bindungsplätze erhöht wird, die vor der Ac-Extraktion durch Fettsäuren^{12b} belegt waren.

BPB-Zusatz (außen) [mg%]	mg% freies Bromphenolblau in:		
	Human-Mischserum	HSA	TCA-HSA
10	2,6	0,6	2,3
20	8,8	5,6	6,2
30	13,6	13,2	11,6
Regressionskoeffizienten	0,6	0,6	0,5

Tab. 2. „Klassische“ Gleichgewichtsdialysen von 1-proz., gegen Tyrodelösung erschöpfend dialysierten Proteinlösungen. Innenflüssigkeit: 3,0 cm³ Proteinlösung, Außenflüssigkeit: 15 cm³ Tyrodelösung (ohne Glucose). Das Dialysegleichgewicht für BPB war bei 4° C innerhalb 48 Stdn. eingestellt.

Die gemessenen Werte liegen innerhalb der bei Dialysen unumgänglichen Fehlerbreite der Methode.

Innenflüssigkeit	Außenflüssigkeit	$R_{i/a}$
TCA-HSA	HSA	$1,07 \pm 0,04$
HSA	TCA-HSA	$0,96 \pm 0,10$

Tab. 3. „Konkurrenz“-Dialyse von Bromphenolblau gegen HSA und TCA-HSA. Die Dialyse-Ansätze enthielten innen und außen jeweils 1% Protein und 0,02% Bromphenolblau in Veronalpuffer pH 8,5. $R_{i/a}$ gibt das Verhältnis zwischen der Farbstoffkonzentration innerhalb der Dialysemembran und außerhalb der Membran an. Die Ansätze wurden 3 Tage lang bei 4–6° C unter ständigem Umwälzen dialysiert (2 Umwälzungen/min.). Es ist aus der Tabelle ersichtlich, daß die Werte um 1,0 liegen und sich damit innerhalb der Fehlerbreite der Methode bewegen.

^{12b} U. WESTPHAL, J. F. STETS u. S. G. PRIEST, Arch. Biochem. Biophysics **43**, 463 [1953].

¹³ Zusammenfassung bei P. L. CARPENTER, Immunology and Serology, W. B. Saunders Company, Philadelphia und London 1956.

III. Immunbiologische Versuche mit TCA-HSA

1. Außer dem vollständigen oder teilweisen Verlust seiner charakteristischen Löslichkeit ändern sich bei der Denaturierung eines Plasmaproteins durch Hitze, Säuren oder Alkalien häufig auch seine antigenen Eigenschaften¹³.

Nachdem schon KORNER und DEBRO⁶ in qualitativen, orientierenden Versuchen ein TCA-Rattenalbumin mit homologem Antikörper (= AK) gefällt hatten, schien uns eine quantitative immunologische Prüfung des mit TCA behandelten Albumins wichtig. Wir verglichen es mit HSA der Behringwerke (Abb. 3).

Abb. 3. Quantitative Präzipitinreaktion von Kaninchen-Antiserum gegen HSA mit homologem HSA-Antigen (○) und TCA-Albumin (●).

Die Abb. 3 zeigt die quantitative Präzipitinreaktion von Antiserum gegenüber HSA mit seinem homologen Antigen (= AG). Die Kurve fällt im Bereich des Antigenüberschusses steil gegen den 0-Punkt ab. Dies spricht nach COHN¹⁴ ebenso für eine einheitliche AG-AK-Reaktion wie die Tatsache, daß wir in den Überständen der einzelnen Versuche bei qualitativen Testen AG und AK nie nebeneinander fanden¹⁵. Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, konnten wir keine qualitativen oder quantitativen Unterschiede zwischen der Präzipitinreaktion von HSA und dem daraus hergestellten TCA-Albumin feststellen.

¹⁴ M. COHN, L. R. WETTER u. H. F. DEUTSCH, J. Immunology **61**, 283 [1949].

¹⁵ F. E. KENDALL, J. clin. Invest. **16**, 921 [1937].

Wir hatten 3 Kaninchen mit alauopräzipitiertem TCA-Albumin immunisiert; alle 3 Tiere zeigten eine durch Präzipitinreaktion deutlich nachweisbare AK-Bildung. Der Kurvenverlauf der quantitativen Präzipitinreaktion des Antiserums mit dem besten Titer gegen TCA-Albumin ist aus Abb. 4 ersichtlich. HSA zeigt mit demselben Serum keine andere Reaktion.

Abb. 4. Quantitative Präzipitinreaktion von Kaninchen-Antiserum gegen Human-TCA-Albumin mit homologem Antigen (●) und HSA (○). Die beiden an der Abszisse eingezeichneten Punkte demonstrieren die fehlende Präzipitinreaktion mit homologem TCA-Antigen nach Absättigung der Antikörper durch HSA.

Auch die Werte $R = \frac{\text{Antikörper max.}}{\text{Antigen}}$ sind bei den Kurvenverläufen der Abb. 3 und Abb. 4 dieselben. Nach erschöpfender Absättigung des Antiserums durch HSA mit TCA-Albumin konnte keine Präzipitinreaktion mehr erzielt werden. Die Versuche beweisen somit, daß menschliches TCA-Albumin dieselben immunologischen Eigenschaften besitzt wie HSA und auch keine zusätzlich neue Antigeneigenschaft annimmt.

2. Nachdem durch die eingangs beschriebenen Versuche (I, 1.) klargelegt war, daß mittels der TCA-Ac-Extraktion globulinfreies Albumin gewonnen werden kann, interessierte uns die Frage, ob sich auch aus Albumin-Antialbumin-Präzipitaten das AG freisetzen ließe. Wir fanden tatsächlich, daß aus solchen AG-AK-Präzipitaten das reine Albumin großenteils wiedergewonnen werden kann (Abb. 5). Ob sich der AK durch TCA-Ac-Extraktion vollständig vom AG befreien läßt, kann aus unseren Versuchen nicht mit Sicherheit abgeleitet werden, da wir keine erschöpfenden Extraktionen durchgeführt haben.

Abb. 5. Papierelektrophoresen von TCA-Ac-Extrakten aus ^{131}J -HSA-AG-AK-Präzipitaten. A: $0,02\text{ cm}^3$ dialysierter und mit Hilfe von Dextranbrei eingengter TCA-Ac-Extrakt eines ^{131}J -HSA-AG-AK-Präzipitats. Das zurückgewonnene ^{131}J -Albumin ist frei von Globulinen, enthält also keinerlei AK-Spuren. (Färbung mit Amidoschwarz 10 B.) B: Zum Streifen C gehörige Autoradiographie. Die radioaktive Bande deckt sich genau mit der Albuminbande von Human-Mischserum (C). C: $0,02\text{ cm}^3$ nichtradioaktives Human-Mischserum mit ca. $0,01\text{ cm}^3$ radioaktivem TCA-Ac-Extrakt von (A) gemischt. $0,01\text{ cm}^3$ dieses ungefähr 4–5 g-% Protein enthaltenden Gemisches aufgetragen. Färbung vor der Anfertigung des Autoradiogramms.

Jedoch fanden wir, daß ein mit TCA-Ac aus dem AG-AK-Präzipitat extrahiertes ^{131}J -Humanalbumin bei der zweiten Fällung mit Hilfe von Antihumanalbumin-Kaninchenserum praktisch vollständig gefällt werden kann. Damit ist durch eine Kombination von TCA-Ac-Extraktion und AK-Präzipitation offensichtlich eine hochspezifische Reinigung von antigenem Albumin möglich.

Die Tab. 4 zeigt, daß etwa 18–30% des eingesetzten ^{131}J -HSA nach zwei- bis dreimaliger TCA-Ac-Extraktion am AK haften bleiben. Das bedeutet, daß mindestens 70–82% des AG bei diesem Vorgehen vom AK-Präzipitat abgetrennt werden können. Die effektive, d. h. die für weitere Versuche zur Verfügung stehende, Ausbeute an AG betrug nach der ersten AG-AK-Präzipitation und anschließenden TCA-Ac-Extraktion jedoch nur etwa 38 bis 57% ^{131}J -HSA. Diese „effektive“ Ausbeute erhöht sich theoretisch noch um den Betrag, den die unvermeidlichen Verluste während der zahlreichen Arbeitsgänge bei Verwendung von höchstens 1,0 bis 1,5 mg ^{131}J -HSA ausmachen.

Je nach Reinheitsgrad des HSA oder dem Verhältnis AG : AK wurden bei der ersten AG-AK-Präzipitation

4–26% des AG überhaupt nicht erfaßt, sondern blieben im AK-Überstand; kleinere Anteile (1–3%) blieben in den zu den häufigen Waschungen verwendeten NaCl-Lösungen gelöst, ein anderer Teil blieb in den Dialyserschläuchen hängen (1,4–14%); geringe Mengen wurden an die verwendeten Glasgeräte (Pipetten usw.) adsorbiert. Jedenfalls fanden wir im Durchschnitt nur 90% der zur ersten AG–AK-Reaktion eingesetzten ^{131}J –HSA-Radioaktivität bilanzmäßig wieder.

	Mittelwert [%]	Schwankungsbereich [%]
<i>Erste AG-AK-Fällung:</i> (4 Versuche)		
Aus dem AK-Präzipitat nicht extrahierbare AG-Reste	23,2	18–30
AG-Verluste durch Manipulationen, soweit erfaßbar	22,4	12–30
Effektive AG-Ausbeute nach TCA-Ac-Extraktion	44,7	38–57
Insgesamt wiedergefunden	90,3	87,0–93,6
<i>Zweite AG-AK-Fällung:</i> (2 Versuche)		
AG-Verluste im AK-Überstand, incl. NaCl-Überstände von 3 Waschungen	0,7	0,6–0,8
AG-Ausbeute aus dem in <i>n</i> -NaOH gelösten AG-AK-Präzipitat, berechnet auf die eingesetzte TCA-AG-Menge	102	101–103

Tab. 4. Bilanz der ^{131}J -Humanalbumin-Versuche mit Antigen-Antikörper-Präzipitation und nachfolgender TCA–Ac-Extraktion. Eingesetzte AG-Radioaktivität=100% gesetzt.

Dagegen blieben bei der zweiten AG–AK-Reaktion bei Antikörperüberschuß, also nach der TCA–Ac-Extraktion des ersten AG–AK-Präzipitats, weniger als 1% dieses immunologisch und mit TCA–Ac gereinigten ^{131}J –HSA–AG in den Überständen gelöst. Dies bedeutet eine spezifische und praktisch vollständige AK-Präzipitation eines AG. Die in den Überständen gefundenen Werte sind absolut verlässlich, da hier direkte Messungen in Fiolaxgläschen ohne vorausgehende Verdünnungen durchgeführt wurden, so daß Pipettenfehler und Fehlermultiplikationen nicht in Frage kommen.

Diskussion

Vor SCHWERT² haben bereits LEVINE⁴ sowie DELAVILLE⁵ beobachtet, daß TCA-Präzipitate von HSA bzw. Rinderalbumin in polaren Lösungsmitteln löslich sind. Nahezu gleichzeitig mit SCHWERT haben KORNER und DEBRO⁶ die Verwendung von TCA-Äthanol für die Herstellung von Albumin empfohlen. Alle diese Autoren fanden, daß nur die TCA-Fällung von Albuminen reversibel ist, während Globuline nach einer TCA-Fällung nicht mehr in Lösung gehen. Nach unseren Befunden werden jedoch nach einer Neutralisierung der TCA mit NaHCO_3 außer den gesamten Albuminen auch gefällte α - und β -Globuline teilweise wieder löslich. Durch TCA werden also bei saurem p_{H} offensichtlich nur γ -Globuline vollständig und irreversibel gefällt. Dagegen ist die Irreversibilität der α - und β -Globulinfällung beim TCA–Ac-Extraktions-Verfahren in erster Linie dem Ac zuzuschreiben, während Albumine durch die Anwesenheit von TCA im Sinne von SCHWERT spezifisch gegen die Ac- oder Alkohol-Fällung bei Zimmertemperatur geschützt werden.

Die genannten Autoren^{2, 4–6} stimmen darin überein, daß Albumine durch eine TCA-Behandlung ihre wesentlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht verlieren. Unsere Befunde über die papierelektrophoretische Beweglichkeit, das Farbstoff-Bindungsvermögen und die immunologischen Eigenschaften von TCA–HSA ergänzen diese Untersuchungen; die einfache TCA–Ac-Methode ist demnach zur Herstellung von biologisch einwandfreien, hochgereinigten Albuminen geeignet.

Darüber hinaus ist bemerkenswert, daß sich durch eine TCA–Ac-Behandlung ein Protein-AG, nämlich HSA, aus einem AK-Präzipitat extrahieren läßt. Es ist zwar seit langem bekannt, daß verschiedene AK-Präzipitate oder Agglutinate von Antigenen ohne definierten Proteincharakter (z. B. Bakterien, Pneumokokken-Polysaccharide¹⁶, auch Tabakmosaikvirus¹⁷) mit Hilfe von Essigsäure^{17, 18} oder Salzlösungen¹⁶ getrennt werden können; ferner wurden für solche Zwecke Proteasen¹⁹ oder verdünnte Alkalien²⁰ verwandt. Abgesehen von Diphtherietoxi-

¹⁶ M. HEIDELBERGER, F. E. KENDALL u. T. TEORELL, J. exp. Medicine **63**, 819 [1936]; M. HEIDELBERGER u. F. E. KENDALL, J. exp. Medicine **64**, 161 [1936].

¹⁷ H. FRIEDRICH-FREKSA, persönl. Mitteilung.

¹⁸ G. RAMON, C. R. Soc. Biol. **88**, 167 [1923]; C. R. Séances [Doklady], Acad. Sci. URSS Filiales **176**, 267 [1923], zit. nach H. SCHMIDT, Fortschritte der Serologie, Verl. Steinkopff, Darmstadt 1955.

¹⁹ M. L. PETERMANN u. A. M. PAPPENHEIMER, J. Phys. Chem. **45**, 1 [1941]; C. G. POPE, Brit. J. exp. Pathol. **20**, 132, 201 [1939].

²⁰ S. C. LIU u. H. WU, Chin. J. Physiol. **25**, 465 [1942], zit. n. l. c.²².

nen^{18, 19, 21} und Ovalbumin²⁰ ist uns jedoch über eine befriedigende Trennung von präzipitierten Protein-Antiproteinsystemen bisher nichts bekannt geworden. Die TCA-Ac-Extraktion stellt also nach unseren Versuchen eine weitere brauchbare Methode zur Rückgewinnung von löslichem und immunologisch unversehrtem Albumin-AG aus AK-Präzipitaten dar.

Methodik

1. TCA-Ac-Extraktion von Seren

Die Proteinlösungen wurden genau nach der Vorschrift von SCHWERT² mit gleichen Volumina 10-proz. TCA gefällt, die Präzipitate sofort abzentrifugiert, mit 80-proz. Ac extrahiert, nochmals abzentrifugiert, und die albuminhaltigen Überstände gegen H₂O ausdialysiert. Aus den dialysierten und notfalls anschließend zentrifugierten Extrakten wurden aliquote Teile für die N-Bestimmung nach Kjeldahl entnommen. Vor der Papierelektrophorese wurden die Extrakte durch Pervaporation eingeeengt, wobei allerdings durch Eintrocknen von Proteinen an der Innenseite der Dialysiermembran Verluste von 10–40% entstanden; die Denaturierung durch Trocknung ist um so umfangreicher, je mehr H₂O abgedampft wird.

2. TCA-Fällung mit nachfolgender Neutralisation

Jeweils 10 cm³ Humanserum wurden mit 10 cm³ 10-proz. TCA versetzt. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde in 10 cm³ H₂O suspendiert und mit ca. 250 mg NaHCO₃ (wegen der CO₂-Schaumbildung vorsichtig etappenweise) neutralisiert. Die neutralisierte Lösung wurde bei 20 000 g klar abzentrifugiert. Weitere Verarbeitung wie unter 1. nach der Ac-Extraktion beschrieben, jedoch Dialyse gegen Tyrodelösung ohne Glucose.

3. Farbstoff-Bindungsversuche

Es wurde Bromphenolblau (Tetrabromphenolsulphthalein, E. Merck, Darmstadt) verwendet. Die „klassischen“ Gleichgewichtsdialysen wurden durchgeführt wie bei l. c.¹² beschrieben. Details dieser Methode und der „Konkurrenz“-Dialysen werden a. a. O.⁸ beschrieben werden.

4. Immunologische Versuche

Zur Erzeugung von Antiseren gegen hochgereinigtes und elektrophoretisch geprüftes HSA (Behring) und gegen das aus diesem gewonnene TCA-Albumin wurden jeweils mehrere Kaninchen immunisiert. Jedes Tier erhielt 150 mg Protein als alaupräzipitiertes²² AG

innerhalb 4 Wochen, auf 15 i. v. Injektionen verteilt, gespritzt. Wir entbluteten die Tiere 6 Tage nach der letzten Injektion. Die quantitative Präzipitationsreaktion mit den besten Antiseren führten wir nach der Technik von HEIDELBERGER und KENDALL²³ durch; die Ansätze enthielten je 1,5 cm³ Antiserum, und AG in steigender Menge in 1,5 cm³ gepufferter 0,9-proz. NaCl-Lösung, pH 7,2. Nach 24 Stdn. wurden die Präzipitate dreimal in 0,9-proz. NaCl-Lösung gewaschen und vor der Stickstoffbestimmung in 1-n. NaOH gelöst. Die Überstände prüften wir qualitativ auf AG und AK.

5. TCA-Ac-Extraktion der ¹³¹I-AG-AK-Präzipitate

Für unsere 2 ersten Versuche wurden je 1,12 mg = 15,4 μ C ¹³¹I-RISA (Abbott Lab., Chicago), für die 3 letzten Versuche je 1,5 mg = 4,3 μ C ¹³¹I-HSA eigener Herstellung²⁴ mit Kaninchen-Antihumanalbumin-Serum von hohem AK-Titer im Äquivalenzbereich präzipitiert. Die AG-AK-Präzipitate wurden 5- bis 10-mal mit je 3 cm³ 0,9-proz. NaCl-Lösung gewaschen, mit 0,05 cm³ H₂O und 0,25 cm³ 10-proz. TCA versetzt, aufgerührt und abzentrifugiert, danach in 0,1 cm³ H₂O und 0,4 cm³ Ac aufgeschlämmt und abzentrifugiert. Die Überstände dialysierten 48–72 Stdn. gegen H₂O; die Präzipitate wurden 1–2-mal in 5-proz. TCA resuspendiert, zentrifugiert und mit 0,5 cm³ 80-proz. Ac extrahiert; diese zweiten oder dritten Extrakte dialysierten gemeinsam mit den ersten.

Bei 2 Versuchen entnahmen wir erst nach der Pervaporation einen aliquoten Teil von 0,1 cm³ zur Radioaktivitätsmessung, bei 3 späteren Versuchen schon vor der Pervaporation.

Mit den pervaporierten Extrakten führten wir Papierelektrophoresen durch. Zwei nicht-pervaporierte Extrakte wurden nochmals mit der berechneten Menge AK versetzt, und die Radioaktivität der 3-mal mit je 3 cm³ 0,9-proz. NaCl-Lösung gewaschenen Präzipitate sowie der Überstände gemessen.

Zur Messung der Radioaktivitäten (jeweils mindestens 20 000 Impulse) benutzten wir einen Szintillationsbohrloch-Kristall (Friesseke & Höpfner, Erlangen) und Fiolaxgläschen (Schott & Gen., Mainz).

6. Die Technik der Papierelektrophoresen und Autoradiographien

Diese Verfahren sind in der Arbeit l. c.²⁴ beschrieben.

Einen Teil der Versuche führten wir im Rahmen von Arbeiten durch, die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und von einer Stiftung der Robert Bosch GmbH., Stuttgart, unterstützt werden. Frl. RODENWALDT und Frl. STEITZ danken wir für die technische Assistenz.

²¹ C. G. POPE, Brit. J. exp. Pathol. **38**, 207 [1957].

²² E. A. KABAT u. M. M. MAYER, Experimental Immunochimistry, Springfield 1948.

²³ M. HEIDELBERGER u. F. E. KENDALL, J. exp. Medicine **61**, 563, [1935]; **62**, 697, [1936].

²⁴ E. KALLEE u. G. SEYBOLD, Z. Naturforsch. **9b**, 307 [1954].