„Elphor“-Gerät ausgewertet. Fig. 1 zeigt Kontaktaufnahme der in das Basisgel hineindiffundierten Proteine.

Bezeichnet man die Meßwerte des Abschnitts *a* als 100%, so findet sich im Abschnitt *b* vom Albumin 50% und in *c* noch 5%, vom γ -Globulin in *b* 47% und in *c* noch 6%, vom α_2 -Makroglobulin in *b* 50% und in *c* noch 4%. Die Diffusionsrate ist somit von ähnlicher Größenordnung, obwohl die Mol-Gew.²⁾ sich wie 69000:152000:846000 verhalten.

Auch die Immunelektrophorese ist geeignet, den Verlauf der Diffusion von Serumproteinen in Schichtgelen von Agar

Fig. 1. Abschnitt *a* zeigt die Serumproteinfraktionen Albumin, γ -Globulin und α_2 -Makroglobulin ohne vorherige Gelpassage, Abschnitt *b* dieselben Mengen nach der Diffusion durch ein Mischgel aus Agar und Carboxymethylcellulose, und Abschnitt *c* dasselbe nach der Diffusion durch zwei solche Mischgele

zu verfolgen; die hohe Empfindlichkeit der serologischen Methode erlaubt den qualitativen Nachweis sehr kleiner Mengen. Dazu werden 3 Agargele von 1½% auf einem Elphor-Glasplättchen übereinander gelegt. Auf die Mitte des obersten Gels legt man ein Stück Whatman-Papier Nr. 17 von 4 × 20 mm, das ausgiebig mit dem zu prüfenden Serum getränkt wurde¹⁾. Nach 24 Std in feuchter Kammer legt man

Fig. 2. Ergebnis der Immun-Elektrophorese im mittleren Agargel *A*₂ und im Basisgel *A*₃

die Agargele einzeln auf Elphor-Glasplättchen und führt die Immunelektrophorese aus³⁾. Wir bezeichnen das oberste Gel mit *A*₁, dann folgend *A*₂ und *A*₃. Die Fig. 2 zeigt das Ergebnis der Immun-Elektrophorese in den Gelen *A*₂ und *A*₃.

Während in *A*₂ noch alle Präzipitatlinien des Serums vorhanden sind, zeigt das *A*₃-Gel im Sektor des α_1 -Globulins und β -Globulins bereits Lücken. Die kombinierte Prüfung der Diffusion einzelner, genau untersuchter Fraktionen mit jener von Sera sollte Zusammenhänge erkennen lassen zwischen Diffusionsgeschwindigkeit und Teilchengröße, ein Problem, wie es durch WIEME⁴⁾ bei Patientensera mit Makroglobulin sowie durch HEIDE, SCHMIDTBERGER und SCHWICK⁵⁾ bei rein isolierten α_1 -, α_2 und β -Lipoprotein aufgenommen wurde. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist ferner abhängig von der Gelstruktur; so fand sie POLSON⁶⁾ für Ovalbumin, Tetanusantitoxin und Hämocyanin in 0,5% Agargel kaum beeinflusst, dagegen bereits in 1% Agargel für die größeren Proteine verlangsamt.

Medizinische Universitätsklinik, Zürich

CH. WUNDERLY

Eingegangen am 18. September 1958

*) Kalle & Co., Wiesbaden-Biebrich.

**) In dankenswerter Weise von den Behringwerken, Marburg a.d. Lahn, zur Verfügung gestellt.

¹⁾ WUNDERLY, CH., u. V. BUSTAMANTE: Klin. Wschr. 35, 758 (1957). — ²⁾ SCHULTZE, H.E.: Clin. Chim. Acta 3, 24 (1958). — ³⁾ WUNDERLY, CH.: Experientia 13, 421 (1957). — ⁴⁾ WIEME, R.J.: Klin. Wschr. 34, 1264 (1956). — ⁵⁾ HEIDE, K., R. SCHMIDTBERGER u. G. SCHWICK: Behringwerk-Mitg. Heft 33 (1957). — ⁶⁾ POLSON, A.: Biochim. Biophys. Acta 29, 426 (1958).

Die Auswertung des Molekulargewichtes der Makromoleküle aus dem maximalen Gradienten der experimentellen Kurve der Ultrazentrifuge

Es ist möglich, den Quotienten s/D (s = Sedimentationskonstante, D = Diffusionskonstante) unmittelbar aus den durch Messungen mit der Ultrazentrifuge gewonnenen Werten der Maximalgradienten zu ermitteln.

Wenn sich die gelösten Moleküle in einer sektorförmigen Unterschichtungszelle befinden, die mit der konstanten Geschwindigkeit ω rotiert, und wenn die Gradientenkurve einer idealen Lösung durch den Boden und den Meniskus dieser Zelle nicht beeinflusst wird, kann man den Maximalgradienten mit Hilfe der folgenden Formel darstellen:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)_{\max} = \frac{c_0 e^{-2s\omega^2 t}}{\sqrt{4\pi D \alpha t}} \left\{ 1 - k \frac{D \alpha t}{r_{\max}^2} + O(r; D; s; t) \right\}. \quad (1)$$

Darin bedeuten $(\partial c/\partial r)_{\max}$ den Maximalgradienten der Konzentration der gelösten Makromoleküle, c_0 ihre Anfangskonzentration, $r_{\max}$ den entsprechenden Abstand des Maximalgradienten von dem Rotationszentrum, t die Zeit, k eine kleine Konstante, $O(r; D; s; t)$ Glieder höheren Grades; für α gilt

$$\alpha = (e^{2s\omega^2 t} - 1)/2s\omega^2 t. \quad (2)$$

Bei nicht sehr langen Sedimentierungszeiten wird $kD\alpha t/r_{\max}^2 \ll 1$, und man kann den Wert der geschweiften Klammer in (1) gleich 1 setzen; dann erhält man aus (1) und (2)

$$\left[\frac{1}{c_0} \left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)_{\max} \right]^2 4\pi t = \frac{2s\omega^2 t e^{-4s\omega^2 t}}{D(e^{2s\omega^2 t} - 1)}. \quad (3)$$

Die Entwicklung nach Potenzen von $s\omega^2 t$ ergibt:

$$\left[\frac{1}{c_0} \left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)_{\max} \right]^2 4\pi t = g = \frac{1}{D} \left[1 - 5 \frac{s\omega^2 t}{1} + \frac{37(s\omega^2 t)^2}{3} + \dots \right]. \quad (4)$$

Wenn t genügend klein gegen $1/(s\omega^2)$, also $s\omega^2 t \ll 1$ ist, kann man die höheren Glieder in (4) vernachlässigen und setzen:

$$g = \frac{1}{D} - 5\omega^2 \frac{s}{D} t. \quad (5)$$

Es wird darum vorgeschlagen, die entsprechenden g -Werte der ersten Aufnahmen auszuwerten und als Funktion der Zeit t darzustellen. Für kurze Sedimentierungszeiten muß diese Funktion nach (5) eine gerade Linie ergeben, welche die Ordinatenachse für $t=0$ in dem Punkt $g=1/D$ schneidet. Die Steigung der Geraden liefert nach (5) s/D .

Da man aber die „wahre Zeit“ nicht immer einwandfrei bestimmen kann, ist es zweifelhaft, ob der Wert g für die experimentelle Anfangszeit wirklich dem Wert $1/D$ entspricht. Die Steigung der Kurve jedoch, und damit auch s/D , ist von der Anfangszeit unabhängig und konstant. Sie ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichtes M mit Hilfe der Svedbergschen Formel¹⁾:

$$M = - \frac{RT}{1 - V^* \rho} \frac{s}{D}. \quad (6)$$

Darin bedeuten R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur, V^* das partielle spezifische Volumen und ρ die Dichte der Lösung.

An Stelle der Konzentrationen können auch die Brechungsindizes benutzt werden:

$$\frac{1}{c_0} \left(\frac{\partial c}{\partial r}\right)_{\max} = \frac{1}{n_{L_0} - n_{LM}} \left(\frac{\partial n}{\partial r}\right)_{\max}. \quad (7)$$

Darin ist $(\partial n/\partial r)_{\max}$ der Maximalgradient des optischen Brechungsindex, n_{L_0} der Brechungsindex der Lösung bei $t=0$ und n_{LM} der Brechungsindex des Lösungsmittels. Die experimentelle Kurve liefert den Wert $(\partial n/\partial r)_{\max}$; c_0 wird vor dem Versuch festgestellt. Darum muß man die bekannten Methoden anwenden, um $(\partial n/\partial r)_{\max}$ in $(\partial c/\partial r)_{\max}$ umzuwandeln oder um $n_{L_0} - n_{LM}$ zu bestimmen. Zu diesem Zweck benötigt man sowohl den optischen Vergrößerungsfaktor der Gradientenkoordinate als auch den der r -Koordinate.

Benutzt man an Stelle einer sektoralen eine rechteckige Unterschichtungszelle und stellt man mit der oben beschriebenen Methode die Funktion g dar, so wird in (5) lediglich der Zahlenfaktor 5 im zweiten Gliede rechts durch den Faktor 3 ersetzt.

Ich möchte es nicht versäumen, Herrn Prof. Dr. KURT FELIX an dieser Stelle meinen aufrichtigsten Dank für seine großzügige Unterstützung auszusprechen, die mir die Durchführung meiner Arbeit ermöglichte.

Institut für vegetative Physiologie der Universität, Frankfurt am Main

MATATIAHU GEHATIA

Eingegangen am 4. Dezember 1958

¹⁾ SVEDBERG, T., u. K.O. PEDERSEN: Die Ultrazentrifuge, S.6. Dresden u. Leipzig: Th. Steinkopff 1939.