Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 309–313, Juli 1971

Isolierung und Kristallisation von α_1 -Foetoprotein aus einem primären Leberzellcarcinom¹⁾

II. Mitteilung

Von F.-G. LEHMANN und DOROTHEE LEHMANN

Medizinische Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. G. A. Martini) Marburg/Lahn

(Eingegangen am 10. Februar 1971)

Die Reindarstellung und Kristallisation von α_1 -Foetoprotein gelingt aus hepatozellulären Karzinomen durch Hitzefällung, Calciumphosphatgelabsorption, fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation, Anionenaustauscherchromatographie, Gelfiltration und fraktionierte Immunabsorption mit IgG-Präparationen gegen Verunreinigungen, die in den ersten kristallinen Präparaten enthalten sind. Aus 1000 g Tumorgewebe werden 57,1 mg Reinsubstanz bei einer Ausbeute von 8,8% isoliert. Das reine α_1 -Foetoproteinpräparat zeigt in der Polyacrylamidgelelektrophorese und immunologisch mit monospezifischen Plasmaantisera und Hyperimmunsere gegen Hepatomplasma, Hepatomextrakt, verschiedene Foetoproteinpräparate, foetale Leber und normale Leber als einzige Verunreinigung Gc-Globulin in einer Konzentration unter 1%; völlige Reinheit kann durch weitere Immunabsorption erzielt werden.

α_1 -Foetoprotein: II, Isolation and crystallization from a primary liver cell carcinoma

α_1 -Foetoprotein was isolated and crystallized from primary liver cell carcinoma by heat precipitation, calcium phosphate gel absorption, fractionated ammonium sulfate precipitation, anion exchange chromatography on DEAE-A 50-Sephadex, gel filtration on Sephadex G 100 and unspecific stepwise immune-absorption with IgG-preparations to the impurities of the first crystalline α_1 -Foetoprotein-preparation. 57.1 mg pure foetoprotein was obtained from 1000 g tumor with a yield of 8.8%.

In polyacrylamide gel electrophoresis and in immunological studies with 24 monospecific antisera to human plasma proteins and hyperimmune sera to normal plasma, hepatoma plasma, hepatoma crude extract, foetal and normal liver and different crystalline and pure α_1 -Foetoproteins, the pure foetoprotein preparation shows only Gc-Globuline as impurity in a concentration lower than 1%. Complete purity is achieved by further immune-absorption with Anti-Gc-Globulin-IgG.

Tumorantigene haben in den letzten Jahren zunehmend Bedeutung in Untersuchungen zur Karzinogenese und Tumorummunologie gewonnen (Übersichten bei 1, 2). Eine biochemische, immunologische oder biologische Charakterisierung menschlicher Tumorantigene setzt jedoch die Reindarstellung dieser Substanzen voraus. Foetoproteine sind als Tumorantigene besonders interessant, da sie nicht nur in maligne degenerierten Geweben, sondern auch in normaler foetaler menschlicher Leber synthetisiert werden können. Die Aufklärung der Ursache der Neosynthese dieser Foetoproteine in Karzinomen könnte wesentliche Erkenntnisse über maligne Tumoren vermitteln. Wir haben kürzlich über die Isolierung und Kristallisation eines menschlichen Tumorantigens, des α_1 -Foetoproteins, aus dem Plasma eines Patienten mit primärem Leberzellkarzinom berichtet (3). Im folgenden wird die Reindarstellung und Kristallisation von α_1 -Foetoprotein aus dem Tumorgewebe im quantitativ-biochemischen Verfahren beschrieben.

Material und Methoden

Material

Wir bezogen komplettes Freundesches Adjuvans von Biological Laboratories, Baltimore, Agar-Noble von Difco, Detroit, Agarose

von Behring, Marburg, DEAE A 50-Sephadex und Sephadex G-100 von Pharmacia, Uppsala und DEAE-Cellulose, Typ S-S 50, von Serva Heidelberg. Die Chemikalien stammten von Merck, Darmstadt.

Anti-Humanserum vom Kaninchen, Anti-Kaninchen-Serum vom Esel, Anti-Kaninchen- γ -Globulin von der Ziege, sowie 24 monospezifische Antiseren gegen Humanplasmaproteine bezogen wir von Behring, Marburg; Anti-Kaninchen- γ A-Globulin, Anti-Kaninchen- γ G-Globulin und Anti-Kaninchen- γ M-Globulin stammten von Miles-Seravac, Lausanne.

Monospezifisches Anti- α_1 -Foetoprotein vom Kaninchen (Charge 1818) wurde von Herrn Dr. S. BAUDNER (Behringwerke Marburg/L) präpariert und uns lebenswürdigweise zur Verfügung gestellt (3).

Weitere Antiseren erhielten wir durch Immunisierung nach dem in l. c. (3) angegebenen Schema sowohl mit kristallinem α_1 -Foetoprotein aus dem Plasma unseres Patienten mit primärem Leberzellkarzinom als auch mit kristallinem α_1 -Foetoprotein aus dem Tumorgewebe, über dessen Reindarstellung im folgenden berichtet wird. Anti-Hepatomplasma-Serum und Anti-Heptatom-Serum gewannen wir durch Immunisierung von Kaninchen mit Plasma oder Tumorextrakt des Patienten.

Anti-„Humanalbumin“-IgG stellten wir aus eigenen Antiseren gegen Humanalbumin „reinst“ der Firma Behring, Marburg, durch Fällung mit Ammoniumsulfat und Chromatographie über DEAE-Cellulose her; das gewonnene IgG-Präparat war polyvalent und enthält Antikörper gegen mindestens 12 Plasmaproteine vom Präalbumin- bis zum β -Globulin-Bereich (3).

Anti-„ α_2 -Antithrombin“-IgG wurde ebenfalls durch Fällung mit Ammoniumsulfat und Chromatographie über DEAE-Cellulose aus einem Antiserum gegen stark angereichertes α_2 -Antithrombin der Fa. Behring (Charge 1763) hergestellt. Diese IgG-Fraktion war ebenfalls unspezifisch und zeigte Antikörper gegen mindestens 10 Proteine des α_1 -bis β -Globulinbereiches.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Le 205/4).

Methoden

Eiweiß wurde mit dem Biuretreagenz nach BEISENHERZ (4) gemessen; in hämoglobinhaltigen Extrakten wurde die Modifikation von BODE, GOEBELL und STÄHLER (5) angewandt. Die Ammoniumsulfatmolarität der Proteinlösungen wurde während der Aufarbeitung durch Messung mit NESSLERS Reagenz nach BEISENHERZ (4) kontrolliert. α_1 -Foetoprotein wurde quantitativ durch radiale Immundiffusion nach MANCINI (6), wie in l. c. (3) angegeben, bestimmt. Calciumphosphatgel wurde nach den Angaben von KEILIN und HARTREE (7) hergestellt. Die Doppeldiffusion erfolgte nach OUCHTERLONY (8), die Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS (9) in der Mikromodifikation von SCHEIDEGGER (10) und die zweidimensionale Immunelektrophoretische Analyse nach LAURELL (11) mit den Modifikationen von CLARKE und FREEMAN (12) und PFLEIDERER, LINKE und REINHARDT (13). Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde als Flachdiskelektrophorese, System Desaga, Heidelberg, mit dem Puffersystem nach ALLEN (persönliche Mitteilung) der Fa. Ortec, Oak Ridge/Tenn., nach ALLEN, MOORE und DILWORTH (14) von Herrn Dr. R. QUAST (Hygiene-Institut der Universität Marburg) in 4proz., 6proz. und 8proz. Polyacrylamidgel durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit 0,25proz. Coomassie-Brillant-Blau (Serva, Heidelberg), die Auswertung mit dem Vitatron UFD-Densitometer.

Isolierung von α_1 -Foetoprotein

Alle Reinigungsschritte wurden bei 4° in der Kühlzelle mit 0,2M Sørensenpuffer, der 1 mM EDTA enthielt, pH 7,5, durchgeführt, soweit keine anderen Angaben gemacht werden.

Rohextrakt

Die 3150 g schwere Leber eines 49jährigen Patienten (Ja. Fr.) mit histologisch gesichertem primären Leberzellkarzinom auf dem Boden einer kleinknotigen Leberzirrhose wurde 48 Stdn. post exitum durch Autopsie gewonnen. Das Tumorgewebe wurde makroskopisch von gesundem Lebergewebe freipräpariert (Tumorgewicht 2130 g) und bis zur Aufarbeitung bei -20° eingefroren. Das Rohhomogenat wurde nach dem Auftauen durch Extraktion von 1000 g Tumorgewebe in dem dreifachen Volumen demineral. Wasser im Starmix (1 g Tumorgewebe in 3 ml H₂O) und Abzentrifugieren bei 3000 g gewonnen.

1. Reinigungsschritt: Hitzegefällung

Der Rohextrakt wurde 10 Min. auf 50° erhitzt, danach im Eisbad gekühlt und bei 3000 g abzentrifugiert.

2. Reinigungsschritt: Calciumphosphatgelabsorption

In den Überstand wurden 30 mg Calciumphosphatgel (bezogen auf Trockengewicht) nach KEILIN und HARTREE pro ml Proteinlösung über 30 Min. bei 4° eingerührt; α_1 -Foetoprotein wurde an das Gel gebunden; das Gel wurde bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch einmalige Zugabe des zweifachen Volumens 0,5M Sørensenpuffer mit 1 mM EDTA, pH 7,5, (zwei Teile Puffer auf einen Teil Gel) wurde α_1 -Foetoprotein nach Homogenisierung über 5 Min. im Starmix durch die Phosphationen aus der Bindung an das Gel verdrängt; Gel und α_1 -Foetoprotein enthaltender Überstand wurden bei 3000 g getrennt.

3. Reinigungsschritt: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Dieser Überstand des 3000 g-Zentrifugates wurde durch Zugabe festen Ammoniumsulfates bis 40% gesättigt und über Nacht gerührt; nach Sedimentierung des Niederschlages bei 12000 g wurde der Überstand bis 70% mit (NH₄)₂SO₄ gesättigt, 4 Stdn. gerührt und erneut bei 12000 g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in einem kleinen Volumen Puffer aufgenommen und 48 Stdn. bei ständigem Pufferwechsel gegen 0,01M Sørensenpuffer mit 50 μ M EDTA, pH 7,5, dialysiert.

4. Reinigungsschritt: Anionenaustauscherchromatographie

Nach Entfernung denaturierten Proteins bei 12000 g wurde das Dialysat auf eine mit 0,01M Sørensenpuffer mit 50 μ M EDTA,

Abb. 1

4. Reinigungsschritt: Chromatographie an einer DEAE-A50-Sephadexsäule ($\varnothing$ 7,2 cm, h = 50 cm; V = 1630 ml). Nachweis des α_1 -Foetoprotein im Mikro-OUCHTERLONY-Test. Der schraffierte Bereich des Eluates wurde bei der Aufarbeitung vereinigt

— Protein — — — NaCl

pH 7,5, äquilibrierte DEAE-A50-Sephadex-Säule aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer ausgewaschen. Die an DEAE-Sephadex gebundenen Proteine wurden sodann mit einem linearen flachen NaCl-Gradienten eluiert (Mischgefäß: 10 l 0,01M Sørensenpuffer mit 50 μ M EDTA, pH 7,5; Gradientengefäß 10 l Puffer wie im Mischgefäß, der 0,5M NaCl enthielt). α_1 -Foetoprotein wurde durch Austesten der einzelnen Fraktionen im Mikro-OUCHTERLONY-Test gegen monospezifisches Antiserum im letzten Proteingipfel zusammen mit dimerem Albumin gefunden (Abb. 1). Die α_1 -Foetoprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, durch Zugabe festen (NH₄)₂SO₄ bis 70% Sättigung ausgefällt, bei 30000 g abzentrifugiert und in einem kleinen Volumen Puffer aufgenommen.

5. Reinigungsschritt: Gelfiltration

Die Proteinlösung wurde auf eine mit 0,2M Sørensenpuffer mit 1 mM EDTA, pH 7,5, äquilibrierte Sephadex-G 100-Säule aufgetragen und mit dem Äquilibrierungspuffer eluiert. α_1 -Foetoprotein erschien im zweiten Proteingipfel (Abb. 2). Die entsprechenden Fraktionen wurden wiederum vereinigt und α_1 -Foetoprotein durch langsame Zugabe festen Ammoniumsulfates bei pH 7,35 bei etwa 60% Sättigung auskristallisiert. Das Rohkristallat wurde durch weitere Zugabe von Ammoniumsulfat bis 70% Sättigung, Zentrifugation bei 30000 g und Aufnahme in Puffer konzentriert und gegen Puffer wie oben angegeben dialysiert.

Abb. 2

5. Reinigungsschritt: Gelfiltration an einer Sephadex-G 100-Säule ($\varnothing$ 7,2 cm, h = 80 cm) Elution mit 0,2M Sørensenpuffer pH 7,5. Kritisch für das Auflösungsvermögen ist der Auftrag eines kleinen Volumens (unter 30 ml Proteinlösung). Der schraffierte Bereich zeigte im Mikro-OUCHTERLONY-Test gegen Anti- α_1 -Foetoproteinserum α_1 -Foetoprotein an; bei der Aufarbeitung wurden diese Fraktionen des Eluates vereinigt

6. Reinigungsschritt: 1. Immunabsorption

Die Entfernung der in der ersten kristallinen Präparation enthaltenen Verunreinigungen erfolgte durch zwei aufeinanderfolgende unspezifische Immunabsorptionen. Das Prinzip besteht in der stufenweisen Absorption der Verunreinigung durch spezifische IgG-Antikörper. Die überschüssigen oder unspezifischen IgG-Globuline werden anschließend durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen bis 40%, 45% und 50% aus der Proteinlösung entfernt; α_1 -Foetoprotein präzipitiert in unserem Puffersystem bei pH 7,5 auf dieser Reinigungsstufe erst zwischen 55 und 65% Sättigung. Die Antigen-Antikörper-Komplexe und die Ammoniumsulfatpräzipitate werden jeweils mit Puffer bzw. mit Puffer, der 40%, 45% oder 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthält, gewaschen, um mitgerissenes α_1 -Foetoprotein zurückzugewinnen. Die technischen Einzelheiten sind in l. c. (3) angegeben. Die erste Immunabsorption wurde mit Anti-„Humanalbumin“-IgG im Äquivalenzbereich zwischen Albumin und Anti-Albumin-IgG durchgeführt (Abb. 3b). Das Präparat enthielt vorwiegend Antikörper gegen Albumin und weiterhin Antikörper gegen 12 Proteine des α_1 - β -Globulinbereiches. Das Ergebnis dieser Absorption ist aus Abbildung 3b, Abbildung 4 und Tabelle 2 ersichtlich. Das 91% reine α_1 -Foetoproteinpräparat kristallisierte erneut bei 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung bei pH 7,4; die Kristalle wurden bei 36000 g abzentrifugiert, in Puffer aufgenommen und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -frei dialysiert.

7. Reinigungsschritt: 2. Immunabsorption

Die zweite Immunabsorption wurde nach demselben Prinzip mit Anti-„ α_2 -Antithrombin“-IgG durchgeführt. Dieses Präparat, das durch Immunisierung mit angereichertem α_2 -Antithrombin gewonnen worden war, enthielt als „Verunreinigung“ Antikörper gegen mehr als 10 Proteine im α_1 -, α_2 - und β -Globulinbereich. Darunter waren auch Antikörper gegen die vier noch in unserem Präparat nachgewiesenen Verunreinigungen (Gc-Globulin, Coeruloplasmin, α_1 -B-Glycoprotein und ein unbekanntes Protein mit

der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit von Gc-Globulin 1—1, siehe Tab. 2), wovon Gc-Globulin und Coeruloplasmin auch immunoelektrophoretisch nachgewiesen werden konnten (Abb. 3a). Nach Entfernung überschüssiger bzw. unspezifischer IgG-Immunglobuline durch fraktionierte Ammonium-

Abb. 3

6. und 7. Reinigungsschritt: Unspezifische Immunabsorption. Oben: Abb. 3a: Immunelektrophorese gegen unabsorbiertes α_2 -Antithrombin-IgG, oberes Loch: α_1 -Foetoprotein nach 6 Reinigungsschritten (zweite Kristalle), unteres Loch: α_1 -Foetoprotein nach 7 Reinigungsschritten (dritte Kristalle); das immunoelektrophoretisch nachweisbare Gc-Globulin und Coeruloplasmin ist nach der Absorption verschwunden; α_1 -B-Glycoprotein und „Gc-X-Globulin“ sind vor der Immunabsorption nur im Makro-Ouchterlony entdeckbar. Unten (Abb. 3b): Immunelektrophorese gegen unabsorbiertes Anti-Humanalbumin-IgG, oberes Loch: α_1 -Foetoprotein nach 5 Reinigungsschritten (erste Kristalle), unteres Loch: α_1 -Foetoprotein nach 6 Reinigungsschritten (zweite Kristalle)

Siehe auch Abb. 4 und Tab. 2

Abb. 4

Polyacrylamidgelelektrophorese-diagramme verschiedener Aufarbeitungsschritte bei der Isolierung von α_1 -Foetoprotein aus einem Hepatom. Zur Identifizierung der Verunreinigungen: siehe Tab. 2. In den zweiten Kristallen befinden sich etwa 7% Gc-Globulin, etwa 1—2% Coeruloplasmin, unter 1% α_1 -B-Glykoprotein und unter 1% „Gc-X-Globulin“. In den dritten Kristallen beträgt die Verunreinigung an Gc-Globulin knapp 1%. α_1 -Foetoproteingehalt in den zweiten Kristallen 91%, in den dritten Kristallen 99%

Tab. 1
 Kristallisation von α_1 -Foetoprotein aus einem primären Leberzellkarzinom

	ml	mg Protein	%	mg α_1 -Foetoprotein	%
Tumorextrakt	2780	61500	100	650	100
Hitzeschritt	2610	29900	48,6	523	80,5
Calciumphosphatgel	3120	15100	24,5	312	48,0
Ammoniumsulfat { 40% Überstand	3370	10500	17,1	276	42,5
70% Sediment	200	8650	14,1	200	30,8
Anionenaustauscherchromatographie	55	333	0,54	122	18,8
Gelfiltration (Erste Kristalle)	23	150	0,24	111	17,1
1. Immunabsorption (Zweite Kristalle)	38,6	87,6	0,14	79,9	13,8
2. Immunabsorption (Dritte Kristalle)	3,2	57,7	0,09	57,1	8,8

sulfatfällungen wurden erneut bei 62% Sättigung weiße nadel-förmige Kristalle mit Seidenglanz erhalten, die gewaschen und in physiol. Natriumchloridlösung aufgenommen wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Nach der Kristallisation und Reindarstellung von α_1 -Foetoprotein aus menschlichem Plasma wird nun über die Kristallisation und Isolierung eines menschlichen Tumorantigens aus dem Tumorgewebe selbst berichtet. α_1 -Foetoprotein kann nach unseren heutigen Kenntnissen im Erwachsenenalter als Tumorantigen betrachtet werden; bei normalgewichtigen Neugeborenen ist dieses Protein nach 14 Tagen und bei Frühgeburten spätestens 4 Wochen post partum in biologischen Flüssigkeiten und Leberextrakten nicht mehr nachweisbar; die Neosynthese von α_1 -Foetoprotein konnte bisher nur bei Teratoblastomen, primären Leberzellkarzinomen und in seltenen Fällen auch in entdifferenzierten Magenkarzinomen nachgewiesen werden. Unsere Reinigung nach sieben Isolierungsschritten ergibt ein 99% reines Produkt bei einer Ausbeute von 8,8% (siehe Tab. 1). Aus einem Kilogramm Tumorgewebe konnten 57,1 mg Reinsubstanz ge-

wonnen werden. Immunologisch konnte als einzige Verunreinigung Gc-Globulin mit 24 monospezifischen Antiseren gegen Humanplasmaeiproteine erkannt werden (Tab. 2). In der Polyacrylamidgelelektrophorese konnte ebenfalls nur eine einzige Verunreinigung, die weniger als 1% des Gesamtproteingehalts der Reinsubstanz ausmacht, gefunden werden. Diese Verunreinigung liegt an der Stelle des Gc-Globulins. Mit Hyperimmunseren gegen den Tumorextrakt — das Ausgangsmaterial der Aufarbeitung — gegen das reine aus dem Tumorgewebe isolierte α_1 -Foetoprotein, gegen das Plasma des Patienten, gegen reines α_1 -Foetoprotein aus menschlichem Plasma, gegen normales menschliches Plasma, gegen foetalen Leberextrakt oder gegen einen Extrakt aus normaler Erwachsenenleber konnten weitere Verunreinigungen nicht gefunden werden.

Die Ausbeute von etwa 10% läßt sich wesentlich verbessern, wenn der zweite Isolierungsschritt so abgewandelt wird, daß α_1 -Foetoprotein nicht an das Calciumphosphatgel gebunden wird. Dies kann dadurch erreicht werden, daß der Tumorextrakt nicht in deionisiertem Wasser, sondern in 0,01M Sørensenpuffer, der 50 μ M EDTA enthält, bei einem pH von 7,5 gewonnen wird. Der relativ große Verlust bei der Elution des α_1 -Foetoproteins aus dem Gel kann so vermieden werden. Eine 100proz. Reinheit unseres Präparates ist durch Absorption mit Anti-Gc-Globulin-IgG zu erzielen. Im übrigen zeigt das Aufarbeitungsprotokoll, daß mit jedem Isolierungsschritt 50% der Fremdproteine entfernt werden; der kritische Schritt neben der Anionenaustauscherchromatographie ist die Immunabsorption mit Antikörpern gegen die im ersten und zweiten kristallinen Präparat noch enthaltenen Verunreinigungen. Unsere Ergebnisse zeigen, daß Immunpräzipitationen eine hochspezifische Anreicherung im quantitativ-biochemischen Maßstab ergeben; beim sorgfältigen Waschen aller Immunpräzipitate ist der Verlust an α_1 -Foetoprotein bei diesem Schritt gering. Eine weitere Vereinfachung ist durch Anwendung von unlöslichen Immunabsorbentien oder quervernetzten IgG-Präparationen, z. B. nach der Methode von AVRAMIAS (15) zu erwarten, da diese leicht nach Bindung der Verunreinigungen durch einfache Zentrifugation entfernt werden können. Die von uns verwendeten unspezifischen IgG-Globuline gegen Humanalbumin und α_2 -Antithrombin können durch Anti-Humanplasma-IgG oder eine IgG-Präparation ersetzt werden, die durch Immunisierung mit dem Überstand einer 45% Ammoniumsulfatfällung normalen menschlichen Plas-

Tab. 2

Immunologisch nachweisbare Verunreinigungen in kristallinen α_1 -Foetoproteinpräparaten aus Hepatomegewebe nach 6 bzw. 7 Reinigungsschritten mit monospezifischen Plasmaeiproteinantisera (OUCHTERLONY-Test; Makroverfahren)

Monospezifisches Antiserum gegen	Klassifikations-Nr. nach SCHULTZE u. HEREMANS (19)	α_1 -Foetoprotein	
		2. Kristalle	3. Kristalle
Albumin	1	⊗	⊗
Präalbumin	2	⊗	⊗
α_1 -Lipoprotein	10	⊗	⊗
Saures α_1 -Glykoprotein	11	⊗	⊗
α_1 -Antitrypsin	12	⊗	⊗
α_1 -B-Glykoprotein	13	+	⊗
Prothrombin	—	⊗	⊗
α_1 -T-Glykoprotein	16	⊗	⊗
Gc-Globulin	21	+	+
„Gc-X-Globulin“*)	—	+	⊗
α_1 -Antichymotrypsin	22	⊗	⊗
Inter- α -Trypsin-Inhibitor	23	⊗	⊗
α_2 -Antithrombin	—	⊗	⊗
Haptoglobin	30	⊗	⊗
Coeruloplasmin	31	+	⊗
α_2 -Makroglobulin	33	⊗	⊗
α_2 -HS-Glykoprotein	35	⊗	⊗
Zn- α_2 -Glykoprotein	36	⊗	⊗
C'-I-Esterase-Inhibitor	37	⊗	⊗
Transferrin	61	⊗	⊗
Plasminogen	81	⊗	⊗
β_2 -Glykoprotein I	82	⊗	⊗
β_2 -Glykoprotein II	82	⊗	⊗
β_2 -Glykoprotein III	82	⊗	⊗

*) Unbekanntes Protein mit der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit von Gc-Globulin 1—1, welches nach völliger Absorption mit Anti-Gc-Serum nachweisbar ist. Wir danken Herrn Dr. S. BAUDNER (Behringwerke, Marburg/L), der einen Teil der Untersuchungen liebenswürdigweise durchgeführt hat.

Das viele Zubehör macht sie so universell

Wir meinen natürlich nicht die nette junge Dame aus unserer Buchhaltung, sondern unsere Ultrazentrifuge „Omega II“. Sie ist praktisch für jeden interessant, der in Forschung und Wissenschaft auf Gebieten wie Medizin, Biochemie, Pharmazie usw. mit Ultrazentrifugation zu tun hat. Dabei spielt es keine Rolle, ob für präparative oder für analytische Zwecke zentrifugiert wird, oder ob es sich um Zonal- bzw. Dichtegradienten-Zentrifugation handelt.

So kompliziert der Sedimentationsprozeß auch sein mag, die Bedienungs-freundlichkeit der „Omega II“ macht ihn zur „Knopfdruck-Sache“. Außergewöhnliche Lauf-ruhe und hohe Drehzahlen bis 70 000 U/m sind für die „Omega II“ eine Selbst-verständlichkeit. Geradezu revolutionierend ist jedoch das neuartige Temperatur-Meßverfahren, durch das es heute möglich ist, Temperaturen direkt im schnelllaufenden Rotor präzise zu ermitteln.

Um die Vielfalt der Einsatz-möglichkeiten des Omega II-Systems richtig zu erkennen, müssen Sie unbedingt unsere Sonder-prospekte haben.

Verlangen Sie deshalb bitte ausführliche Unterlagen unter Kennziffer 12/165
HERAEUS-CHRIST GMBH
3360 OSTERODE
Postfach 1220

Heraeus

Christ

Auch die kleinste Bestellung wird von uns wie ein großer Auftrag behandelt.

Eine Ratte – drei Tage schwanger.
Eine männliche Maus – 18-20 gr. schwer.
Oder irgendeine Maus oder Ratte nach Ihren
speziellen Wünschen.

Wir sind für jede Bestellung dankbar,
egal ob sie groß oder klein ist. Dafür liefern
wir Ihnen die besten Versuchstiere, die Sie
kaufen können. Diese Tiere werden unter
denselben gewissenhaften Bedingungen
gezüchtet, die von den Charles River Labo-
ratorien in ganz Nord-Amerika gestellt
werden.

Da dies die besten und gesündesten
Tiere sind, die zur Verfügung stehen, benö-
tigen sie keine besonderen Behausungen,
um einheitlichere Forschungsergebnisse zu
erzielen. Das bedeutet, dass die Auswertung
der wissenschaftlichen Fakten äußerst
präzise ist. Was wollen Sie mehr?

Die Arche Noah nahm immer nur
zwei Tiere auf. Wir verschicken unsere
Versuchstiere auch einzeln – oder so viele
wie Sie wollen. Ein Anruf genügt:
(35) 77 18 87.

Charles River FROM THE
St. Aubin-les-Elbeuf / France S.A. HAND OF THE
VETERINARIAN
TO RESEARCH

mas gewonnen wurde. Da relativ große Antikörpermengen zur Absorption benötigt werden, ist die Anwendung des von uns vorgeschlagenen Immunisierungs- und Entblutungsverfahrens hilfreich, mit dem hohe Antikörpertiter bei Serumausbeuten über 200 ml/Tier erzielt werden (3). Die von uns beschriebene Methode zur Reindarstellung bietet wesentliche Vorteile hinsichtlich Ausbeute und Reinheit der Substanz gegenüber den von GUSEV und YAZOVA (16), NISHI (17), PURVES, VAN DER MERVE und BERSON (18) und RAPP und LEHMANN (20) vorgeschlagenen Verfahren.

Die biochemische, immunologische und biologische Charakterisierung des reinen Glykoproteins, über die an anderer Stelle berichtet wird, kann möglicherweise erste Aufschlüsse über den Mechanismus der Neosynthese von Foetoproteinen in maligne degenerierten Geweben bringen. Für die klinische Diagnostik ist

durch Standardisierung mit eingewogenen lyophilisierten Präparaten eine vollquantitative Bestimmung von α_1 -Foetoprotein im Serum, Ascites, Tumorextrakten, usw. möglich; durch Gewinnung hochtitriger monospezifischer Antiseren ist darüber hinaus eine Verbesserung der Diagnostik mit Ausschluß falschpositiver Ergebnisse durch unspezifische Präzipitationen möglich.

Wir danken Herrn Dr. S. BAUDNER, Behringwerke Marburg/Lahn, für die Überlassung von α_1 -Foetoproteinserum und für die Hilfe bei der immunologischen Charakterisierung der Verunreinigungen in kristallinen α_1 -Foetoproteinpräparationen mit monospezifischen Humanplasma-Antiseren, Herrn Dr. R. QUAST (Hygiene-Institut der Universität Marburg, Direktor: Prof. Dr. R. SIEGERT) für die Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese und Herrn Priv.-Doz. Dr. P. SCHMITZ-MOORMANN (Pathologisches Institut der Universität Marburg, Direktor: Prof. Dr. W. HORT) für die Durchführung der Autopsie und die histologischen Untersuchungen.

Literatur

1. BALDWIN, R. W., *Rev. Europ. Etudes clin. biol.* 15, 593 (1970).
 2. PIESSENS, W. F., *Cancer* 26, 1212 (1970). — 3. LEHMANN, F.-G., D. LEHMANN und G. A. MARTINI, *Clin. chim. Acta*, Amsterdam 33, 199 (1971). — 4. BEISENHERZ, G., H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GABARDE, E. MEYER-ARENDE und G. PFLEIDERER, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 (1953). — 5. BODE, CH., H. GOEBELL und E. STÄHLER, *diese Z.* 6, 418 (1968). — 6. MANCINI, G., J. P. VAERMAN, A. O. CARBONARA und J. F. HEREMANS, *Coll. Prot. biol. fluids* 11, 370 (1963). — 7. KEILIN, D. und E. F. HARTREE, *Biochem. J.* 49, 88 (1951). — 8. OUCHTERLONY, Ö., *Progr. Allergy* 5, 1 (1958). — 9. GRABAR, P. und C. A. WILLIAMS, *Biochem. biophys. Acta*, Amsterdam 10, 193 (1953). — 10. SCHEIDEGGER, J. J., *Int. Arch. Allergy* 7, 103 (1955). — 11. LAURELL, C. B., *Analyt. Biochem.* 10, 358 (1965). — 12. CLARKE,

H. G. M. und T. FREEMAN, *Coll. Prot. biol. fluids* 14, 503 (1966). — 13. PFLEIDERER, G., LINKE, R. und G. REINHARDT, *Comparat. biochem. Physiol.*, 33, 955 (1970). — 14. ALLEN, R. C., D. J. MOORE und R. H. DILWORTH, *J. Histochem. Cytochem.* 17, 188 (1969). — 15. AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK, *Immunochemistry* 6, 53 (1969). — 16. GUSEV, A. I. und A. K. YAZOVA, *Biokhimiya Moskva* 35, 31 (1970). — 17. NISHI, S., *Cancer Res.* 30, 2507 (1970). — 18. PURVES, L. R., E. VAN DER MERVE und I. BERSOHN, *S. Afr. J. Med.* 44, 1264 (1970). — 19. SCHULTZE, H. E. und J. F. HEREMANS, *Molecular biology of human proteins with special reference to plasma proteins Vol. I*, S. 176–178. Elsevier Publ. Comp., Amsterdam-London-New York (1969). — 20. RAPP, W. und H. E. LEHMANN, *Clin. chim. Acta*, Amsterdam 31, 45 (1971).

Dr. med. Frank-Günter Lehmann und Dorothee Lehmann
 Med. Univ. Klinik
 355 Marburg/Lahn
 Mannkopffstr. 1