

**Chemistry.** — *De spreiding van het seroglycoïd en het crystalbumine van HEWITT.* By E. GORTER and G. J. ELINGS.

(Communicated at the meeting of May 25, 1946.)

Onlangs hebben GORTER en HERMANS <sup>1)</sup> de resultaten meegedeeld van een onderzoek naar de spreiding van een complex eiwit, opgebouwd uit albumine en 40 % lipoïden: het lipo-proteïne van MACHEBOEUF. Daarbij bleek, dat dit complex bestaat uit eiwit met 39.6 % lipoïden en 13.1 % cholesterine van de droge stof. De spreiding onderscheidde zich weinig van die van een eiwit zonder lipoïden.

Wij hebben nu onderzocht, hoe de spreiding is van de glyco-proteïnen. Wij kozen daarvoor het seroglycoïd van HEWITT <sup>2)</sup>.

*Bereiding.* Het seroglycoïd werd door ons bereid uit runderbloed of uit dat van een nuchter kalf. Na stolling van het bloed wordt het serum afgegoten. Aan het serum wordt een gelijke hoeveelheid verzadigde ammoniumsulfatoplossing, die op pH 7.0 was gebracht, toegevoegd om de globulinen neer te slaan. Deze worden door centrifugeren verwijderd. De albuminen, die in oplossing zijn, worden nu gefractionneerd neergeslagen met azijnzuur, totdat de pH 4.4 is. Het neerslag bevat het crystalbumine. Dit wordt weer telkens opgelost in water en neergeslagen. De aldus gevormde achtereenvolgende neerslagen met ammonium-sulfaat en azijnzuur zijn B<sub>1</sub>—B<sub>9</sub> genoemd. De oplossingen, die bij het praecipiteeren telkens in oplossing blijven, bevatten voornamelijk seroglycoïd: dit is *b* genoemd. In vele gevallen werd nog een verdere fractionneering toegepast door zooveel verzadigd ammonium-sulfaat van een pH 4.4 toe te voegen aan de oplossing, die dezelfde pH had tot een eindconcentratie van 65 % en later van 75 % bereikt was. De hierbij ontstane neerslagen werden genoemd C en de oplossingen, die overbleven en die het seroglycoïd bevatten, *c*.

Tenslotte werd nog nagegaan of een verdere fractionneering met trichloorazijnzuur 20 % mogelijk was. Hierbij bleek, dat wanneer men zooveel toevoegde, dat de eindconcentratie 2 % trichloorazijnzuur bedroeg, alle eiwitten, dus ook het seroglycoïd, uit de vloeistof was neergeslagen. Voegde men evenwel eerst een kleinere hoeveelheid trichloorazijnzuur tot een eindconcentratie van 0.5 % bereikt was toe, dan gelukte het om het serumglycoïd neer te slaan. De oplossing van dit trichloorazijnzuurneerslag van seroglycoïd is *D* genoemd.

(Alle neerslagen zijn steeds aangegeven met *A.B.C.D.*, alle eiwitoplossingen met *a.b.c.d.*)

---

<sup>1)</sup> Proc. Ned. Akad. v. Wetensch., Amsterdam, **45**, 804 (1942).

<sup>2)</sup> HEWITT, L. F., Biochem. J., **30** II, 2230 (1936), **31** I, 360 (1936), **31** II, 1535 (1937).

*Gehalte aan trisacchariden.* In verschillende fracties werd het gehalte aan koolhydraten bepaald. Dit is volgens HEWITT een galactose-mannose-glucosamine. Daartoe werd gebruik gemaakt van de reactie van SØRENSEN en HAUGAARD <sup>3)</sup>).

Wij hebben daarbij gevonden een koolhydraatgehalte, uitgedrukt in glucose, zoals de tabel aangeeft.

Serum op 50% verzaadiging gebracht met ammonium-sulfaat bij pH 7.0.

| Globulinen<br>A   | Resteerende oplossing a           |  |
|---|-----------------------------------|--|
|   | Met azijnzuur                     | Op pH 4,4 brengen  |
| B <sub>1</sub> 2,7 % trisaccharid                         | Resteerende oplossing b           |  |
| B <sub>3</sub> 1,6 % trisaccharid                         | Ammonium-sulfaat oplossing pH 4,4 |  |
| B <sub>6</sub> 0,7 % trisaccharid                         | Toevoegen tot de eindconcentratie |  |
| B <sub>8</sub> 0,5 % trisaccharid                         | 65 % of 75 % bedraagt             |  |
| B <sub>9</sub> 0,5 % trisaccharid<br><i>Crystalbumine</i> | Neerslag C                        | Resteerende oplossing c bevat 5—6,5—7 % trisaccharide, met 20 % CCl <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H brengen op 0,5 % eindconcentratie |
|   | Neerslag D<br><i>Seroglycoïd</i>  | Rest d met 2 % trichloor-azijnzuur slaat alle eiwit neer 6,5 % trisaccharide   |

Uit bovenstaand schema kan men zoowel de wijze van bereiding als de resultaten van de fractionneering, beoordeeld naar het trisaccharide-gehalte, aflezen.

*Bepaling van trisaccharide.*

Benodigde reagentia: a. 60 vol. % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

b. 1.6 % orcinol in 30 vol. % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

c. een versch bereide oplossing van gelijke deelen galactose en mannose in water.

**Uitvoering:** 1 cc van de te onderzoeken vloeistof die 0,02 tot 0,2 mg/cc trisaccharide bevat wordt verwarmd met 2,5 cc van de 1.6 % orcinol-oplossing in 15 cc van 60 vol. % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; dit geschiedt in een kookbuis van 18 cm bij 2½ cm, die geplaatst wordt in een waterbad van 80° gedurende 20 minuten. Na afloop van dezen tijd wordt de buis in koud water gedompeld. Hierbij ziet men een bruine kleur optreden, die lichtgevoelig is, zoodat alle bewerkingen in het donker moe-

<sup>3)</sup> SØRENSEN, MARGR. en HAUGAARD, G., Bioch. Zeitschr., 260, 247 (1933).

ten worden uitgevoerd. Men bepaalt dan colorimetrisch de sterkte van de oplossing door de kleur te vergelijken met die van een standaardoplossing van mannose en galactose, die dezelfde bewerking ondergaat.

Wanneer men nu op de gebruikelijke wijze<sup>4)</sup> deze eiwitoplossingen tracht te spreiden op verdunde buffer-oplossingen van verschillende pH, dan vindt men verschillen, die in de onderstaande figuren zijn aangegeven.

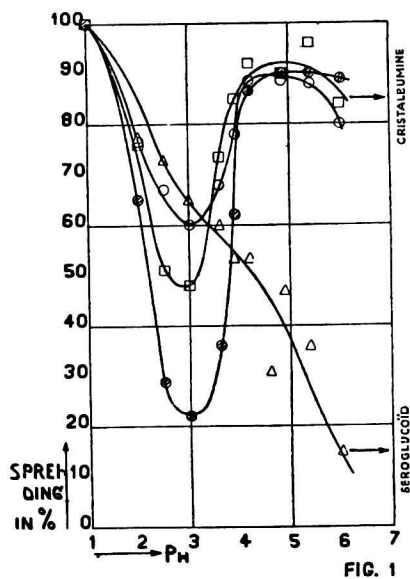
Als bufferoplossingen werden gebruikt:

tusschen pH 1 en 3.3 verdunde HCl-oplossing,

tusschen pH 3.6 en 5.6 azijnzuur-acetaatmengsels 0.0033 mol.

Boven pH 5.6 de veronal-HCl-buffer van MICHAELIS van dezelfde molaire concentratie.

Van elk der eiwit-oplossingen werd eerst de grootte van de spreiding bij pH 1 bepaald. Deze diende als methode om het eiwitgehalte van de oplossing te bepalen. Daarna werd een meting gedaan van de eiwit-oplossingen



Over de pH-spreidingscurven van twee eiwitfractie's uit serum („Hewitt”).

B<sub>1</sub> ○ 2.7 0/0 Trisaccharide

B<sub>6</sub> □ 0.7 0/0 Trisaccharide

B<sub>3</sub> ○ 1.6 0/0 Trisaccharide

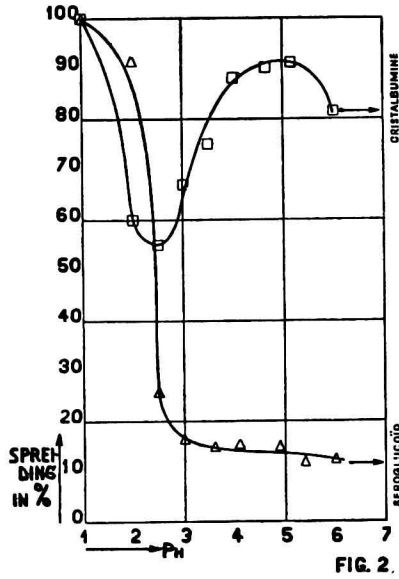
C △ 6.5 0/0 Trisaccharide

op de verschillende buffers. Ook werd een drukoppervlakte-kromme opgeteekend, waaruit door extrapolatie naar een druk 0 de grootte van de spreiding werd bepaald. Na het opbrengen van het eiwit werd steeds 1 minuut gewacht.

Men ziet dat de B<sub>1</sub> fracties (een mengsel van crystalbumine en sero-

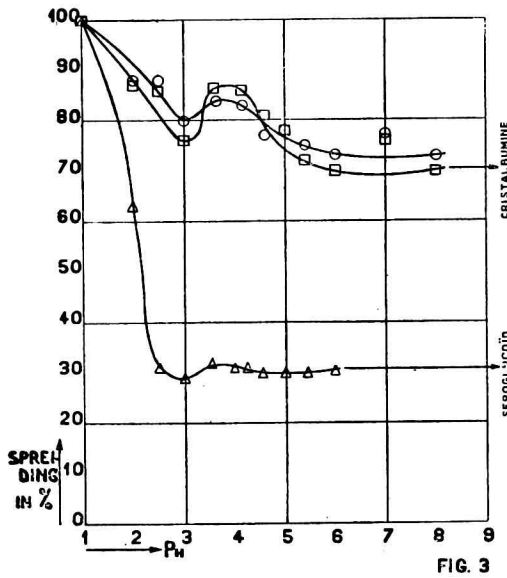
<sup>4)</sup> GORTER, E. e.a., Proc. Kon. Akad. v. Wetensch., Amsterdam, 37, 788 (1934); 29, 371 (1926).

glycoïd met een trisaccharid gehalte van 2.7 % en dat waarschijnlijk nog verontreinigd is met andere eiwitten) zich gedragen als het albumine uit



Over de pH-spreidingscurven van twee eiwitfractie's uit serum („Hewitt”).

B<sub>6</sub> □ 0.8 % Trisaccharide      D<sub>1</sub> △ 7 % Trisaccharide



Over de pH-spreidingscurven van twee eiwitfractie's uit serum („Hewitt”).

B<sub>9</sub> □ 0.5 % Trisaccharide      B<sub>9</sub> □ 0.5 % Trisaccharide  
C<sub>1</sub> △ 5 % Trisaccharide

serum. De kromme waarin de grootte van de spreading is uitgezet tegen de pH vertoont de typische eigenschappen van dit eiwit: maximale spreading

bij pH 1 en bij het iso-electrische punt ( $\pm$  pH 5) en minimum bij pH 3. Scherp daarvan onderscheiden is de kromme voor het seroglycoïd c.

De kromme voor het *seroglycoïd* is in de beide laatste proeven gekenmerkt, doordat reeds bij pH 2.5 een sterke vermindering van de spreiding

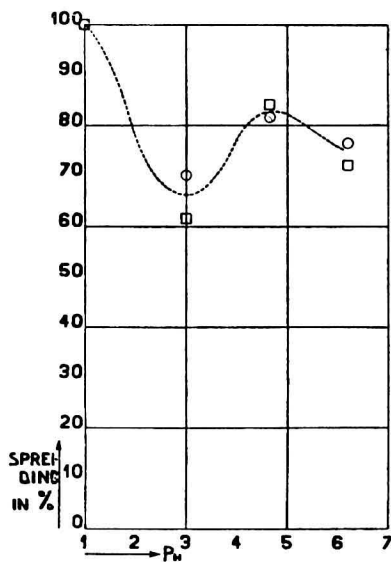


FIG. 4

Over de pH-spreidingscurven van twee eiwitfractie's uit serum („Hewitt”).

B<sub>6</sub> ○ Suikerarme fractie van serum-albumine.

B<sub>6</sub> □ na toevoegen van CCl<sub>3</sub> CO<sub>2</sub>H tot 7% na 30 min. affiltreeren en weer oplossen in AQ met wat NH<sub>4</sub>OH ter neutralisatie

te verkrijgen is bij meer alkalische reactie van de vloeistof. Het ziet er naar uit alsof de aanwezigheid van trisaccharid in het eiwitmolecuul de oplossing hiervan sterk verhoogt.

Het blijkt dat B<sub>3</sub> met een trisaccharid gehalte van 1.6% juist is wat men verwachten kan, als men aanneemt, dat dit preparaat nog een mengsel is van B<sub>6</sub> en c.

Mogelijk is, dat bij de lage pH het koolhydraat van het eiwit wordt gesplitst. Het is begrijpelijk, dat het invoeren van zoovele polaire groepen als het trisaccharid bevat in het eiwitmolecuul de oplosbaarheid doet toenemen en de neiging tot spreiden vermindert.

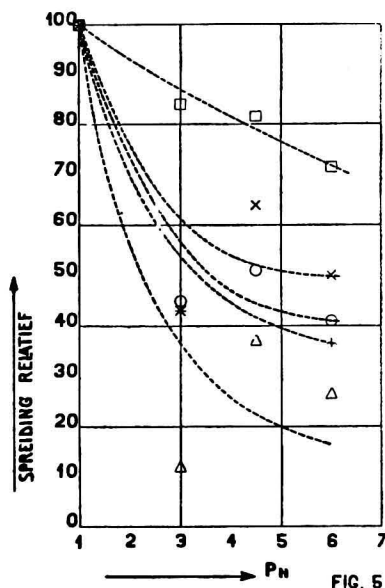
Er is eenige reden om aan te nemen, dat de koppeling van dit trisaccharid aan het eiwit geschiedt tusschen de aminogroep van het glucosamine en de COOH-groepen van het eiwit. Dit zou inderdaad de gebrekkige spreiding aan den alkalischen kant van het iso-electrische punt kunnen verklaren<sup>5)</sup>. Hiermee is niet in tegenspraak wat S. PRZYLECHI en J. CICHOCHEU<sup>6)</sup> heb-

<sup>5)</sup> GORTER, E., VAN ORMONDT, H., MEYER, TH., Complex proteïns. Biochem. J. 29, 38 (1935).

<sup>6)</sup> Biochem. Z. 299, 92 (1938).

ben gevonden, die ertoe besluiten, dat de koppeling niet kan geschieden door middel van de OH-groepen van de suiker onder normale physiologische omstandigheden.

We hebben nog overwogen of de fractie c, die seroglycoïd bevat, mis-



- Bij pH 1 m<sup>2</sup>/cc
- 0.55 O glasvocht.
  - 0.41 + glasvocht met 2½ dln. alcohol neergeslagen en weer opgelost.
  - 0.34 x glasvocht met 10 dln. aceton neergeslagen en weer opgelost.
  - 0.93 □ Hoornvlies in water met spoor KOH opgelost, helder gecentrifugeerd.
  - 27 Δ lenzen in water met spoor KOH opgelost, helder afgecentrifugeerd.

schien daarom slecht spreidt bij een pH > 3.3, omdat het bij de bewerking gedenatureerd is. Men <sup>7)</sup> heeft gevonden, dat gedenatureerde albumine niet spreidt, maar dat het, nadat het op pH 2.4 is gebracht, deze eigenschap weer terugkrijgt. Tegen deze opvatting pleit, dat toevoegen van zuur aan de crystalbumine-oplossing niet de eigenschap om te spreiden herstelt. Bovendien kan men een oplossing van albumine of caseïne niet denatureeren en omzetten in een niet-spreidende stof door dezelfde bewerking als het seroglycoïd heeft ondergaan; neerslaan met half verzadigd ammoniumsulfaat, filtreren, gevolgd door toevoegen van azijnzuur tot pH 4.4 en wederom toevoegen van 2 % trichloorazijnzuur, waarbij men behalve de eerste maal telkens het neerslag weer oplost en neerslaat. Ook het crystalbumine blijkt de bewerking goed te doorstaan; als men een oplossing daarvan een half uur lang wegzet met 7 % trichloorazijnzuur verandert de spreiding nauwelijks.

<sup>7)</sup> GORTER, E. en VAN ORMONDT, H., Biochem., J. 29, 48 (1935).

Als tweede voorbeeld van een glycoproteïne hebben wij het mucine van het glasvocht onderzocht.

Het glasvocht was afkomstig van kalfsoogen. De cornea wordt weggeknipt, waarbij het kamervocht afloopt, de lens wordt verwijderd, dan het oog verder opengeknipt, en het glasvocht verwijderd door druk, waarbij men zorgt, dat geen vocht uit de spieren van het oog of bloed in het glasvocht terecht komt. Het wordt geknipt en gefiltreerd door watten. Het filtraat is een water-heldere vloeistof.

Deze vrij visqueuze eiwitoplossing vertoont op een  $1/10$  N HCl-oplossing pH 1 een duidelijke spreiding, waaruit men kan schatten, dat zij 0.05 % eiwit bevat.

Wanneer men dit glasvocht nu spreidt bij verschillende pH, dan vindt men een soortgelijke kromme als bij het seroglycoïd, als men de grootte van de spreiding uitzet tegen de pH.

Als men het mucoproteïne uit het glasvocht met 2.5 vol. alcohol neerslaat en dit neerslag weer in water oplost, krijgt men eenzelfde resultaat! Ook het neerslag, dat ontstaat door 1 dl glasvocht in 10 dl aceton te brengen, kan men in water weer oplossen. En deze oplossing spreidt ongeveer als het oorspronkelijke glasvocht (zie fig. 4).

Dit zijn slechts zeer voorloopige en onvolledige metingen.

*Conclusie.* Het seroglycoïd van HEWITT, dat als een mucoproteïne dat  $\pm 6$  % van een trisaccharid (galactose — mannose — glucosamine) is op te vatten, vertoont bij het onderzoek in monomoleculaire lagen een spreiding die slechts bij een pH < 3 gemakkelijk is te verkrijgen. Op een vloeistof met een hogere pH is de oplosbaarheid van het seroglycoïd te groot.

Deze geringe spreiding en verhoogde oplosbaarheid worden toegeschreven aan de vervanging van de COOH-groepen van het eiwit door de OH-groepen van het trisaccharid, waarbij dan de aminogroep van het glucosamine zich hecht aan de COOH-groepen van het eiwit.

De spreiding van het crystalbumine is daarentegen zeer veel beter en is ongeveer te verklaren door van de spreiding van het serum albumine, die van het seroglycoïd af te trekken, m.a.w. de kromme van de spreiding van serumalbumine ligt tusschen die van het crystalbumine en het seroglycoïd in.

#### *Summary.*

In a previous paper one of us has published the results of the spreading of a conjugated protein known as MACHEBOEUF's lipoprotein which contains 39.6 % total lipoids. The curve indicating the spreading of this lipoprotein at different pH was not very different from that of other proteins.

Now we shall communicate the results of the spreading of seroglycoïd and crystalbumin, isolated following Hewitt's technique.

After precipitation of the globulins, the albumin fraction was separated in two parts: one soluble fraction containing much sugar and the other far less soluble fraction, which contains only small amounts of sugar. For the determination of the content of trisaccharid of the protein fraction SØRENSEN and HAUGAARD<sup>3</sup>) colorimetric orcinol method was used. The

two fractions were called after Hewitt: one the most soluble fraction is *seroglycoid* (with 7 % carbohydrate), and the other crystalbumine, (which contains only 0.5 % trisaccharid). A mixture of both proteins has the same properties as serum-albumin.

In order to find out the difference in spreading tendency between the two proteins, one has to examine this spreading at various pH. It appears that there is a very great difference in so far that crystalbumin shows the properties of a protein, in which only a few free COO<sup>-</sup> and NH<sup>3+</sup> groups are present, whereas the spreading of seroglycoid with a low minimum at a pH 3.0 and only very little spreading tendency at a higher pH above 3.0 behaves like a protein in which the NH<sup>3+</sup> groups have disappeared and are replaced by acid groups. It is possible that the seroglycoid is more soluble than the crystalbumin fraction owing to the presence in this conjugated protein molecule of several OH groups.

If now we examine the spreading of a natural glycoprotein similar results are obtained.

We have used the humor aqueus from the eyes of a calf. This liquid can be examined in a fresh state. It shows the same type of spreading as the seroglycoid. After precipitation of the protein with acetone or with 2.5 vol alcohol a precipitate is formed that is easily soluble in water and has retained the same spreading qualities as the less pure product (fig. 5). The spreading of these glycoproteins is not due to denaturation.

*Winschoten, 1944.*