

Chromatographie von Polyelektrolyten

VI. Proteinchromatographie auf Ionenaustauscher-Cellulosederivaten*

Von G. SEMENZA

Biochemisches Institut der Universität Zürich

Noch vor wenigen Jahren hielt man es für fast unmöglich, Proteine zu chromatographieren. Diese Auffassung war nicht unbegründet, da diese Polyelektrolyte an den Oberflächen der meisten Adsorbentien leicht denaturiert werden und gegenüber den meisten organischen Lösungsmitteln, extremen pH-Werten und nur leicht erhöhten Temperaturen empfindlich sind. Die Adsorption ist oft irreversibel.

Nachdem jedoch einige Versuche zur chromatographischen Reinigung von einfachen Proteinen gelungen waren – entweder durch Verteilungs-^{1,2} oder durch Ionenaustausch-Chromatographie³⁻⁷, – hat die Proteinchromatographie rasch die Stufe einer allgemein verwendbaren Technik erreicht, und zwar hauptsächlich durch die Arbeiten von TISELIUS *et al.*^{8,9}, SOBER und PETERSON¹⁸⁻²², BOMAN *et al.*¹⁰⁻¹⁷ sowie PORATH^{23,24}.

* Die Arbeiten des Autors, die in dieser Übersicht zitiert sind, wurden in Uppsala angefangen, als er sich dort als Gast des Biochemischen Institutes befand, und zum größeren Teil in Zürich durchgeführt. Der Autor ist Professor F. LEUTHARDT und Professor A. TISELIUS sowie einigen Kollegen, besonders Dozent H. G. BOMAN und Dozent J. PORATH, für das Verständnis und wertvolle Diskussionen zu Dank verpflichtet. Diese Übersicht ist auf einem Kolloquium basiert, welches im Medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern (Direktor: Professor AEBI) abgehalten wurde.

- ¹ A. J. P. MARTIN und R. R. PORTER, *Biochem. J.* 49 (1951) 215.
- ² R. R. PORTER, *Biochem. J.* 53 (1953) 320, 59 (1955) 405.
- ³ S. PALÉUS und J. B. NEILANDS, *Acta Chem. Scand.* 4 (1950) 1024.
- ⁴ C. H. W. HIRS, S. MOORE und W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.* 200 (1953) 493.
- ⁵ H. H. TALLAN und W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.* 200 (1953) 507.
- ⁶ C. H. W. HIRS, *J. Biol. Chem.* 205 (1953) 93.
- ⁷ H. H. TALLAN, *Biochem. Biophysica Acta* 27 (1958) 407.
- ⁸ A. TISELIUS, *Ark. Kemi* 7 (1954) 443.
- ⁹ A. TISELIUS, S. HJERTÉN und Ö. LEVIN, *Arch. Biochem. Biophys.* 65 (1956) 132.
- ¹⁰ H. G. BOMAN, *Biochim. Biophysica Acta* 16 (1955) 245.
- ¹¹ H. G. BOMAN, *Nature* 173 (1954) 447.
- ¹² H. G. BOMAN und L. E. WESTLUND, *Arch. Biochem. Biophys.* 64 (1956) 217.
- ¹³ H. G. BOMAN und L. E. WESTLUND, *Arch. Biochem. Biophys.* 70 (1957) 572.
- ¹⁴ H. G. BOMAN und U. KALETTA, *Biochim. Biophysica Acta* 24 (1957) 619.
- ¹⁵ H. G. BOMAN, in *Symposium on Protein Structure*, herausgegeben von NEURERGER, S. 100, London 1958.
- ¹⁶ H. G. BOMAN, *Ion Exchange Chromatography of Proteins and Some Applications to the Study of Different Phosphodiesterases*, Stockholm/Uppsala 1958.

Es ist kaum mehr möglich, alle Arbeiten zu zitieren, in denen Beispiele chromatographischer Reinigung von Proteinen und Enzymen angegeben sind. Ich werde im folgenden versuchen, eine kritische Übersicht der Proteinchromatographie auf Cellulosederivaten zu geben**. Ich möchte mich dabei hauptsächlich auf methodologische Fragen begrenzen, da bei dieser an sich so wertvollen Technik sehr häufig Artefakte auftreten, die sowohl das Trennvermögen der Adsorbentien vermindern als auch falsche Interpretationen verursachen können.

Ionenaustauscher-Cellulosederivate

Bekanntlich sind diese nicht die einzigen Adsorbentien, die für die Proteinchromatographie gebraucht werden können. Ich möchte dazu den ausgezeichneten Hydroxylapatit TISELIUS^{8,9} und die synthetischen Aus-

** Verwendete Abkürzungen:

CM-C:	Carboxymethyl-cellulose
P-C:	Phosphoryl-cellulose
SM-C:	Sulfomethyl-cellulose
SE-C:	Sulfoäthyl-cellulose
DEAE-C:	Diäthylamino-äthyl-cellulose
TEAE-C:	Triäthylamino-äthyl-cellulose
AE-C:	Aminoäthyl-cellulose
GE-C:	Guanidinoäthyl-cellulose
ECTEOLA-C:	Cellulosederivat, aus Alkalicellulose mit Epichlorhydrin und Triäthanolamin hergestellt ¹⁰
pAB-C:	<i>para</i> -Aminobenzyl-cellulose
DNS:	Desoxynucleinsäure
RNS:	Ribonucleinsäure
RNase:	Ribonuclease
TRIS:	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan.

- ¹⁷ W. BJÖRK und H. G. BOMAN, *Biochim. Biophysica Acta* 34 (1959) 503.
- ¹⁸ H. A. SOBER, G. KEGELES und F. J. GUTTER, *J. Amer. Chem. Soc.* 74 (1952) 2734.
- ¹⁹ E. A. PETERSON und H. A. SOBER, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 751.
- ²⁰ H. A. SOBER, F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF und E. A. PETERSON, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 756.
- ²¹ SOBER H. A. und E. A. PETERSON, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 1711.
- ²² SOBER H. A. und E. A. PETERSON, in *Ion Exchangers in Organic and Biochemistry*, herausgegeben von C. CALMON und T. R. E. KRESSMAN, S. 318, New York 1957.
- ²³ J. PORATH, *Ark. Kemi* 11 (1957) 97.
- ²⁴ J. PORATH, *Zone Electrophoresis in Columns and Adsorption Chromatography on Ionic Cellulose Derivatives as Methods for Peptide and Protein Fractionations*, Uppsala 1957.

tauschharze erwähnen. Die Cellulosederivate werden gewöhnlich den Harzen vorgezogen, da sie ihnen gegenüber zwei große Vorteile aufweisen: Sie denaturieren die Proteine viel weniger und haben eine viel größere Kapazität für die Bindung von Polyelektrolyten. Die erste Eigenschaft ist sehr wahrscheinlich auf ihren rein hydrophilen Charakter zurückzuführen. Die Harze hingegen besitzen ein hydrophobes Gerüst, und es scheint, daß an diesen Oberflächen die Proteine leichter denaturiert werden können*.

Die Tatsache, daß die Cellulosederivate eine höhere Kapazität für Polyelektrolyte aufweisen, wogegen ihre Kapazität für niedermolekulare Ionen viel kleiner ist (etwa ein Zehntel) als diejenige der Harze, ist auf die Lage der aktiven Gruppen zurückzuführen. Die Gruppen der Cellulosederivate sind hauptsächlich an der Oberfläche der Faser fixiert, während diejenigen der Harze mehrheitlich in der Tiefe einer porösen Struktur liegen und deshalb für große Ionen nur schwer oder überhaupt nicht erreichbar sind. Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit durch das Netzwerk von Harzen wurden verwendet, um Polymere von niedermolekularen Stoffen zu trennen (siehe z. B.²⁶).

Leider sind die Cellulosederivate weniger stabil als die Harze; trotzdem können sie (vor allem die Äther) nach Behandlung mit den zur Proteinchromatographie gebrauchten Methoden leicht regeneriert werden. Die Resultate sind daher auch bei häufiger Wiederverwendung reproduzierbar.

Die auf diesem Gebiet verwendeten Cellulosederivate sind – ausgenommen die Oxycellulose – entweder Ester oder Äther. Viele von ihnen wurden ursprünglich im Hinblick auf eine Verwendung in der Textilchemie hergestellt. Die Kationenaustauscher sind in der Tabelle 1 angegeben.

Die CM-C, die SM-C und die SE-C sind Äther; sie werden durch Reaktion der Alkalicellulose mit Monochloressigsäure bzw. Monochloromethansulfonat oder β -Bromäthansulfonat hergestellt. Die P-C ist ein Ester und wird durch Reaktion der

Tabelle 1: Kationenaustauscher-Cellulosederivate für Polyelektrolytchromatographie

	Aktive Gruppe	pK'^*	Referenzen
Oxycellulose	–COO [–]		27
Carboxymethylcellulose (CM-C)	–COO [–]	3,5 bis 3,7	19
Phosphorylcellulose (P-C) . . .	–PO ₃ [–]	6,0**	19
Sulfomethylcellulose (SM-C) . .	–SO ₃ [–]	≈ 2	23
Sulfoäthylcellulose (SE-C) . .	–SO ₃ [–]	≈ 2	23

* In 0,5 M NaCl

** Zweite Dissoziationskonstante

* Aus demselben Grund werden Cellulosederivate, Stärke, Agargel usw. als Träger für die Proteinelektrophorese hydrophoben Materialien (wie Glaspulver usw.) vorgezogen²⁵.

²⁵ A. TISELIUS, in *Methods in Enzymology*, herausgegeben von S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, Band IV, S. 3, New York 1957.

²⁶ H. DEUEL, J. SOLMS, L. ANYAS-WEISZ und G. HUBER, *Helv. Chim. Acta* 34 (1951) 1849.

²⁷ E. C. YACKEL und W. O. KANYON, *J. Amer. Chem. Soc.* 64 (1942) 121.

Alkalicellulose mit POCl₃ hergestellt. Die Oxycellulose ist ein Produkt der Oxydation der Cellulose in Stellung 6 mit Stickstoffdioxid.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, sind SM-C und SE-C stark sauer, die anderen schwach sauer. Einer der Austauscher (die P-C) ist zweiwertig.

Da die Proteine verschiedene Gruppen tragen, die in annähernd neutralem Milieu positiv geladen sind (Amino-, Guanidino-, Imidazol-, Imino-Gruppen), und nur zwei Gruppen, die in neutralem Milieu negativ geladen sind (–COOH und eventuell Phosphoryl-Gruppen*), sollte man mit den Kationenaustauschern ein größeres Trennvermögen erreichen als mit den Anionenaustauschern²⁴. Die Kationenaustauscher haben sich in der Tat hauptsächlich für die Trennung von basischen Peptiden und Proteinen sehr gut bewährt²⁸. Die neutralen oder sauren Proteine weisen natürlich eine viel kleinere Affinität für diese Austauscher auf und können nur bei sehr niedriger Pufferkonzentration adsorbiert werden, was natürlich zu einer Unsicherheit der pH-Werte führt. Trotzdem sind gute Trennungen auch mit nichtbasischen Proteinen erzielt worden (siehe Tabelle 3)²³.

Kationenaustauscher können recht verschiedene Eigenschaften aufweisen. Mit den stark sauren Austauschern (SM-C und SE-C) kann man bei niedrigeren pH-Werten chromatographieren als mit den anderen. Die große Verschiedenheit in der Acidität der –COOH- und –SO₃H-Gruppen sollte auch Unterschiede der Haftfestigkeit verursachen: In der Tat hat man beobachtet, daß die SM-C, nicht aber die CM-C, neutrale Aminosäuren in der freien Form fixieren kann²⁴.

Es ist von historischem Interesse, daß die Oxycellulose das erste Ionenaustauscher-Cellulosederivat gewesen ist, das in der Biochemie als Adsorbens für Proteine gebraucht wurde. ASTWOOD *et al.*²⁹ konnten 1951 das ACTH, durch «batchwise»-Adsorption auf Oxycellulose 40fach reinigen.

Die bisher am meisten verwendeten Cellulosederivate sind Anionenaustauscher. Sie sind in der Tabelle 2 angegeben.

Sehr wahrscheinlich sind alle diese Anionenaustauscher Äther. Die DEAE-C wird durch Reaktion des 2-Chlortriäthylamin mit Alkalicellulose hergestellt. Durch eine ähnliche Reaktion wird die ECTEOLA-C synthetisiert; das Reagens ist hier Epichlorhydrin und Triäthanolamin. Die AE-C wird durch Einwirkung des Taurins^{29a} oder des β -Br-äthylamins⁴⁵ auf Alkalicellulose hergestellt. Die TEAE-C wird durch Äthylierung der DEAE-C mit Äthylbromid synthetisiert. Die GE-C entsteht durch Guanidierung der primären Aminogruppen der AE-C mit o-Methyl-isoharnstoff. Für die pAB-C, wird zuerst die p-Nitro-benzyl-cellulose (durch Behandlung der Alkalicellulose mit p-Nitro-benzyl-chlorid) hergestellt, worauf die Nitrogruppe mit Hydrosulfit reduziert wird.

* Die SH- und die phenolischen OH-Gruppen dissoziieren erst bei so hohen pH, bei denen die Proteine oft der Denaturierungsgefahr unterliegen.

²⁸ J. PORATH, *Ark. Kemi* 11 (1957) 259.

²⁹ E. B. ASTWOOD, M. S. RABEN, R. W. PAYNE und A. B. GRADY, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 2969.

^{29a} W. A. REEVES und J. D. GUTHRIE, *Textile Res. J.* 23 (1953) 522.

Tabelle 2: Anionenaustauscher-cellulosederivate

	Aktive Gruppe	pK'*	Referenzen
Diäthylamino-äthyl-cellulose (DEAE-C)	$-N^+H(CH_2CH_3)_2$	9,5	19
Triäthylamino-äthyl-cellulose (TEAE-C)	$-N^+(CH_2CH_3)_3$	9,5	23
Aminoäthyl-cellulose (AE-C)	$-NH_3^+$	9,30	30
Guanidinoäthyl-cellulose (GE-C)	$-NH-C(NH_2)=NH_2^+$	> 12	30,45
ECTEOLA-cellulose (ECTEOLA-C)	Substituiertes Amin	7,5**	19
p-Amino-benzyl-cellulose (pAB-C)	$-NH_3^+$	< 4	31,32

* In 0,5 oder 1 M NaCl

** Durchschnittlicher pK'-Wert der verschiedenen basischen Gruppen

Die ECTEOLA-C weist kein Trennvermögen für Proteine auf¹⁹; sie ist sehr heterogen (siehe die Titrationskurve in¹⁹). Sie hat jedoch Anwendung bei der Nucleinsäurechromatographie³³⁻³⁵ gefunden. Auch die pAB-C wird wegen ihres zu niedrigen pH-Wertes nicht in der Proteinchromatographie gebraucht; sie ist aber ein sehr günstiges Material für die Herstellung anderer Cellulosederivate (siehe unten).

Alle anderen Anionenaustauscher weisen ein gutes Trennvermögen für Proteine auf und haben in der Proteinchromatographie Anwendung gefunden. Die DEAE-C ist heute der am meisten angewandte Anionenaustauscher (siehe z. B. Abb. 1). Die TEAE-C ist jedoch homogener²³. Die GE-C ist der stärkste Anionenaustauscher, der mit Cellulose als Gerüst hergestellt

wurde, und erlaubt deshalb Chromatographien bei sehr alkalischen pH-Werten. Ihr größter Nachteil besteht in ihrer geringen Stabilität sowohl in stark saurem als auch in stark alkalischem Milieu. Die AE-C hat ein gutes Trennvermögen (siehe Abb. 2). Es ist mindestens so gut, wenn nicht besser, als das der anderen Anionenaustauscher. Sie ist so stabil wie die DEAE-C und befriedigend homogen. 75 bis 80% der aktiven Gruppen sind primäre Aminogruppen. Es ist sehr einfach, die AE-C mit einer gewünschten Kapazität herzustellen.

Bei der Herstellung von Cellulosederivaten für chromatographische Zwecke besteht oft die Gefahr, bei chemisch «guten» Reaktionen (d. h. bei Reaktionen, die eine große Ausbeute geben) zu hohe Substitutionsquoten zu erreichen. Man erhält ein im Wasser gelartiges Produkt, das für die Chromatographie nicht geeignet ist. Deshalb versucht man gewöhnlich die Reaktion früher zu unterbrechen (was oft mangelhafte Reproduzierbarkeit der Substituierungsquoten zur Folge hat) oder man wendet eine die Reaktion limitierende Menge an Reagenzien an, was aber auch gewisse Nachteile hat.

Die gute Reproduzierbarkeit der Substitutionsquoten scheint wichtig zu sein. Es ist nämlich bekannt, daß manchmal Chromatographien, die mit verschiedenen Chargen eines bestimmten Ionenaustauschers

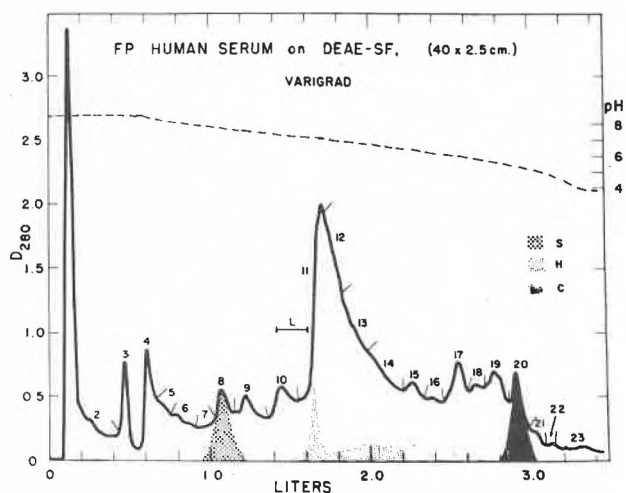


Abb. 1. Chromatographie von menschlichem Serum auf DEAE-C in TRIS-Phosphat-Puffer. Elution durch kontinuierliche Zunahme der Konzentration des Elutionsmittels und Abnahme des pH. Gestrichelte Linie: pH im Effluens, ausgezogene Linie: E_{280} im Effluens; L: Lipoprotein; S: Siderophilin; H: E_{405} ; C: Coeruloplasmin (aus H. A. SOBER und E. A. PETERSON, *Fed. Proc.* 17 [1958] 1116)

³⁰ G. SEMENZA, *Helv. Chim. Acta* 43 (1960) 1057.

³¹ D. H. CAMPBELL, E. LÜSCHER und L. S. LERMAN, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 37 (1951) 575.

³² Prospekt des Serva-Entwicklungslabors, Heidelberg 1959.

³³ A. BENDICH, J. R. FRESCO, H. S. ROSENKRANZ und S. M. BESER, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 3671.

³⁴ A. BENDICH, H. B. PAHL, G. C. KORNGOLD, H. S. ROSENKRANZ und J. R. FRESCO, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 3949.

³⁵ D. F. BRADLEY und A. RICH, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 5898.

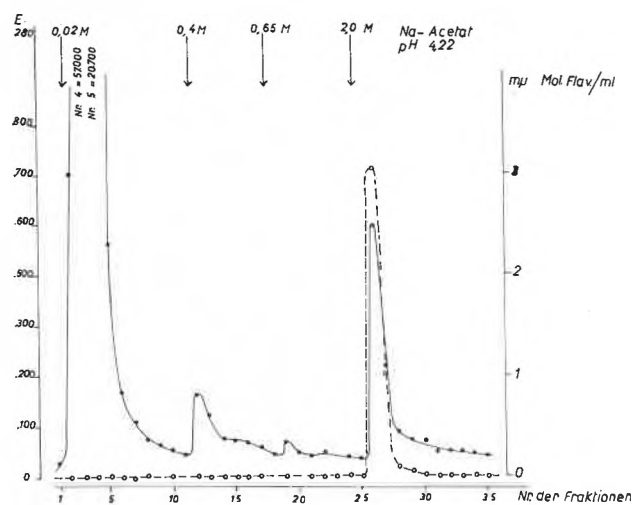


Abb. 2. Chromatographie von Hühneriweiß auf AE-C in Na-Acetat-Puffer, pH 4,22, mit stufenweiser Elution. Gestrichelte Linie: Flavingehalt; ausgezogene Linie: E_{280} . Das Riboflavoprotein, das durch diese einzige Chromatographie erhalten wurde (Fraktionen 26 und 27), erwies sich in der Ultrazentrifuge als einheitlich (aus G. SEMENZA, *Helv. Chim. Acta* 43 [1960] 1057)

durchgeführt wurden, nicht die gleichen Resultate ergaben. Oft ist dieses Phänomen auf die verschiedenen Kapazitäten der einzelnen Produkte zurückzuführen.

Die theoretisch größere Kapazität der hochsubstituierten Produkte für die Proteine ist oft nur ein scheinbarer Gewinn. Da die größere Substituierungsquote auch eine größere Wasseraufnahme verursacht, ist die Kapazität des Cellulosederivates in nassem Zustand, je Volumeneinheit gerechnet, nicht wesentlich vergrößert, während andererseits die physikalischen Eigenschaften bedeutend schlechter geworden sind: Die Durchlaufgeschwindigkeit ist oft zu klein und zu stark vom pH- und der Ionenstärke abhängig geworden.

Die physikalischen Eigenschaften hängen aber auch vom Ausgangsmaterial ab. Wenn Holzcellulose als Ausgangsmaterial verwendet wird, fängt das Produkt an, bei einer Substitutionsquote von etwa 0,9 bis 1 mÄq/g (bei den Anionenaustauschern) oder von etwa 0,5 mÄq/g (bei den starken Kationenaustauschern) gelartig zu werden. Wenn der Ionenaustauscher (in diesem Fall AE-C) aus vernetzter Cellulose hergestellt wird, kann man eine Substitutionsquote von fast 2 mÄq/g erreichen, ohne daß das Produkt wesentlich verschlechterte physikalische Eigenschaften aufweist^{30*}. Man kann auch Linters als Ausgangsmaterial anwenden; in diesem Fall ist der Ionenaustauscher eher fibrös, was bei der Anwendung großer Säulen für präparative Zwecke einen wesentlichen Vorteil bedeutet³⁶.

Bei der Herstellung gewisser Cellulosederivate hat man beobachtet, daß die Substitutionsquote je nach der Größe der Partikel des Produktes verschieden ist. Wenn man den erhaltenen Ionenaustauscher (z. B. DEAE-C) durch Sieben in Teilchen verschiedener Größe aufteilt, so findet man, daß die kleineren Partikel eine größere Substitutionsquote aufweisen als die größeren.

Man hat aus der Cellulose weitere Typen von Adsorbentien hergestellt, die durch spezifische Mechanismen eine auswählende Adsorption erlauben. CAMPBELL, LÜSCHER und LERMAN³¹ haben Proteinantigene mit der pAB-C durch Diazotierung gekoppelt; es ist möglich, an diesem Adsorbens für die Antigene spezifische Antikörper selektiv zu adsorbieren. Dieselbe Reaktion wurde gebraucht³⁷, um Phenole an der Cellulose zu fixieren, die dann eine spezifische Affinität für Tyrosinase aufweist. Histone wurden durch Diazotierung ebenfalls mit pAB-C gekoppelt. Auf diesem Adsorbens kann man erfolgreich Desoxynucleinsäure adsorbieren und fraktionieren³⁸⁻³⁹. Ebenfalls durch Diazotierung haben wir Avidin an die pAB-C gekoppelt. Die so erhaltene Avidin-Azobenzyl-Cellulose hat die Fähigkeit, selektiv Biotin enthaltende

Proteine zu fixieren⁴⁰. Es mag hier auch erwähnt werden, daß STRAUB⁴¹ durch spezifische Adsorption an Stärke in der Kälte die Pancreasamylase isoliert hat. Das Enzym wird dadurch wiedergewonnen, daß man das Adsorptionsmittel mit der daran haftenden Amylase auf 37°C bringt. Nach der Inkubation werden die Abbauprodukte der Stärke durch Dialyse entfernt, und das Ferment bleibt zurück.

Von anderen Cellulosederivaten, die in der Proteinchromatographie noch nicht genügend geprüft worden sind, möchte ich erwähnen: eine Citrat-Cellulose⁴², eine Phosphonomethyl-Cellulose^{42a}, eine Cellulose-Succinat-halbest⁴³, eine Amino- und eine Guanidino-Cellulose⁴⁴, eine organisch gebundenes Hg enthaltende Cellulose⁴⁵ und eine Pyridinium-Cellulose⁴⁶.

Allgemeine Regeln

Charakteristisch für die Ionenaustausch-Chromatographie der Polyelektrolyte ist, daß der R_f -Wert (bzw. das spezifische Retentionsvolumen) außerordentlich empfindlich gegen Änderungen des pH- und Elutionsmittels ist. Natürlich sind auch die chromatographischen Eigenschaften der niedrig-molekularen Stoffe gegen diese beiden Variablen empfindlich. Im Fall der Polyelektrolyte ist aber diese Empfindlichkeit viel größer.

Vom praktischen Standpunkt aus ist also das chromatographische Verhalten eines Polyelektrolyts eher durch den pH-Wert und die Konzentration des Elutionsmittels charakterisiert als durch den R_f -Wert. Diese Besonderheit läßt sich auf Grund des Adsorptions-Elutionsgleichgewichtes verstehen, das sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableiten läßt⁴⁷.

Aus dieser doppelten Empfindlichkeit für Änderungen der Konzentration des Elutionsmittels und des pH-Wertes folgt die Notwendigkeit, beide Variablen so gut wie möglich zu kontrollieren, und die Möglichkeit, die Elution durch Änderungen der einen oder der anderen Größe oder beider herbeizuführen.

Es gibt noch einen weiteren Grund, warum es notwendig ist, sich so streng wie möglich an die folgenden Regeln zu halten. Da die Kapazität aller Austauscher für die Proteine klein ist, arbeitet man fast immer an der Grenze der Säulenkapazität. Diese Tatsache verursacht häufig Artefakte, die im Fall der Chromatographie niedrigmolekularer Stoffe nur mit außerordentlich kleinen Säulen auftreten würden. Wir werden darauf später zurückkommen.

⁴⁰ G. SEMENZA, L. S. PRESTIDGE, D. MÉNARD-JECKER und M. BETTEX-GALLAND, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 669.

⁴¹ F. B. STRAUB, *Society of Experimental Biology, XII Symposium, London 1957*, S. 176.

⁴² U.S. Pat. 2780228 (1957).

^{42a} S. R. HOBART, G. L. DRAKE jr. und J. D. GUTHRIE, *Textile Res. J.* 29 (1959) 884.

⁴³ F. C. MCINTIRE und J. R. SCHECK, *J. Amer. Chem. Soc.* 70 (1948) 1193.

⁴⁴ G. SEMENZA, *Helv. Physiol. Pharm. Acta* 17 (1959) C 39.

⁴⁵ G. SEMENZA, noch nicht veröffentlichte Versuche.

⁴⁶ W. LAUTSCH, G. MANECKE und W. BROSER, *Z. Naturforsch.* 8 B (1953) 232.

⁴⁷ A. TISELIUS, *Ann. Acad. Sci. Fennicae A II* (1955) 257.

* Weitere Prozeduren für die Vernetzung der Cellulose sind später beschrieben worden: J. D. GUTHRIE und A. L. BULLOCK, *Ind. Eng. Chem.*, im Druck.

³⁶ J. PORATH, persönliche Mitteilung.

³⁷ L. S. LERMAN, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 39 (1953) 232.

³⁸ G. L. BROWN und A. V. MARTIN, *Nature* 176 (1955) 971.

³⁹ G. L. BROWN und A. V. BROWN, *Society of Experimental Biology, XII Symposium, London 1957*, S. 6.

Die Dimensionen und das Packen der Säulen brauchen hier nicht allzu detailliert dargelegt zu werden (für eine ausführliche Behandlung siehe DRAKE⁴⁸). Gewöhnlich genügt es, das Adsorbens, nachdem man in der Suspension enthaltene Luftblasen durch partielles Vakuum entfernt hat, unter Wasserdruck und ständigem Rühren so homogen wie möglich in der Säule zu packen⁴⁹.

1. Die erste Regel besteht darin, soweit wie möglich unter Gleichgewichtsbedingungen zu arbeiten. Dies mag selbstverständlich scheinen; dabei ist aber gerade diese Regel am häufigsten nicht befolgt worden.

Die erste Bedingung ist, daß das Adsorbens schon vor dem Beginn der Adsorption vollkommen in derjenigen Form vorliegen muß, in welcher die Chromatographie durchgeführt werden soll¹⁶.

Nach jeder Chromatographie auf AE-C oder DEAE-C wird die Säule mit Lauge gewaschen. Diese wandelt die Säule vollkommen in die OH-Form um. Für den nächsten Versuch muß man den Austauscher wieder in die Form bringen, die während der nächsten Chromatographie gebraucht werden wird (gewöhnlich Cl⁻). Um dies zu erreichen, wurde oft die Säule einfach mit dem Anfangspuffer (z. B. 0,02 M TRIS/HCl pH 7,5) durchgewaschen, bis der pH-Wert der durchgelaufenen Lösung identisch mit demjenigen des Puffers war, der auf die Säule gegeben wurde (dies dauert zwei bis drei Tage). Nun ist es aber zweifelhaft, ob auf diese Weise immer ein vollkommener Übergang der Säule in die Cl-Form zu erreichen ist, weil die Affinität des Austauschers für die OH-Ionen viel größer ist als die Affinität für die Cl-Ionen und das Gleichgewicht sich außerordentlich langsam einstellen kann³⁰. Ein sehr langsamer OH⁻-gegen Cl⁻-Austausch wird aber in Gegenwart eines Puffers keine beträchtliche Änderung des pH verursachen und daher nur schwer feststellbar sein. Dazu kommt noch, daß während der langdauernden Waschung mit alkalischen oder neutralen Lösungen auch eine Fixierung von Carbonat- und Bicarbonationen stattfindet, so daß die scheinbar ins Gleichgewicht gebrachte Säule in Wirklichkeit sich in einer gemischten Form (Cl⁻, OH⁻, Carbonat- oder Bicarbonat) befindet.

Eine unvollständige Umwandlung der Säule in die Cl-Form erklärt das folgende Phänomen. Es ist bekannt, daß bei DEAE-C, AE-C und TEAE-C Säulen, die nach alkalischer Waschung bei neutralem pH regeneriert wurden, eine Erhöhung der Cl-Konzentration des auf die Säule aufgetragenen, eluierenden Puffers zu zwei (oder drei) Stufen in der Cl-Konzentration des Eluats führt, wobei in der Übergangszone das pH vorübergehend alkalischer wird^{16,45,50}. Dies muß der Bildung einer Bicarbonat- und einer OH⁻-Zone zugeschrieben werden, die infolge des Anstiegs der Cl-Konzentration eluiert werden⁵⁰.

Dieses *double fronting* kann offensichtlich Artefakte verursachen, die ich später erwähnen werde.

Wenn es nicht immer möglich ist, den Austauscher bei neutralem pH vollständig aus der OH- in die Cl-Form umzuwandeln, so läßt sich dies doch unter sauren Bedingungen erreichen.

Wie wir beobachtet haben, erhält man eine vollständige Umwandlung, wenn man die Säule mit einer sauren Lösung

⁴⁸ B. DRAKE, *Anal. Chim. Acta* 3 (1949) 452.

⁴⁹ J. PORATH, *Biochim. Biophysica Acta* 22 (1956) 151.

⁵⁰ W. BJÖRK, *J. Chromatogr.* 2 (1959) 536.

durchwäscht, die Cl⁻ enthält. Diese Prozedur verhindert auch, daß Carbonationen von der Säule aufgenommen werden. Der Gebrauch von HCl ist natürlich nicht zu empfehlen, weil die Salzsäure, wenn oft gebraucht, den Cellulosederivaten schaden kann. Es ist auch nicht zu empfehlen, anionische Puffer anzuwenden, die Cl⁻ enthalten, weil diese Prozedur natürlich wieder zu einer gemischten Form führt. Man muß also einen Puffer anwenden, der kationisch ist und der in saurem Milieu wirkt. Die Auswahl ist bekanntlich sehr begrenzt. Ich glaube, den Piperazin/HCl-Puffer, 0,1 M, pH 4,4, mit 20% NaCl, empfehlen zu können³⁰.

Bei Einhaltung dieser Bedingungen ist der Übergang der OH- in die Cl-Form über Nacht schon fast vollständig. Wenn man jetzt die Säule gegen den Anfangspuffer ins Gleichgewicht bringt und sie dann mit einem gleichen, aber konzentrierteren Puffer wäscht, kann man beobachten, daß der Anstieg der Cl-Konzentration im Effluens steil und in einer einzigen Stufe erfolgt und daß die pH-Verschiebung ins Alkalische – wenn überhaupt – schwach und schnell vorübergehend ist^{30,45}.

Es ist empfehlenswert, nicht nur das pH, sondern auch die Cl⁻-Konzentration im ausfließenden Puffer zu kontrollieren. In der Zwischenzeit wird durch Dialyse das zu chromatographierende Gemisch gegen den gleichen Puffer ins Gleichgewicht gebracht.

Ich habe die Regenerierungsprozedur ziemlich detailliert beschrieben, weil es sich um ein wichtiges Problem handelt. Eine mangelhafte Regenerierung der Säulen hat früher oft Mißerfolge verursacht und so zum Mißtrauen mancher Forscher gegen die Eiweißchromatographie beigetragen. Es ist klar, daß in einer Säule, die sich am Anfang in einer gemischten OH-Carbonat-Cl-Form befindet, die Bildung einer OH- oder Bicarbonat-Zone bei jedem Anstieg der Cl-Konzentration Artefakte verursachen kann: es können z. B. homogene Zonen verdoppelt werden, wenn die zusätzlichen OH- und Bicarbonat-Zonen gerade mit der gleichen Geschwindigkeit wandern⁵⁰; oder es kann die Alkalinisierung die Zahl der Ladungen der Proteine und damit natürlich deren chromatographische Eigenschaften ändern. In jedem Fall erhält man sowohl Artefakte als auch eine Verminderung des Trennvermögens des Austauschers. Überdies muß, im Fall von alkaliempfindlichen Enzymen, die Alkalinisierung die Ausbeute herabsetzen.

Eine schlechte Regenerierung der Säulen kann auch für eine schlechte Reproduzierbarkeit der Resultate verantwortlich sein. Es ist nämlich in der Literatur manchmal mitgeteilt worden, daß gewisse chromatographische Resultate erst beim zweiten Experiment reproduzierbar gewesen sind: Die wahrscheinlichste Erklärung ist, daß beim ersten Experiment eine neue, also mit HCl gewaschene DEAE-C gebraucht wurde, die sich vollständig in der Cl-Form befand, während bei späteren Experimenten die Cellulose nur noch unvollständig, wenn auch im Ausmaß reproduzierbar regeneriert wurde.

Man muß auch versuchen, sich während der Elution den Gleichgewichtsbedingungen zu nähern. Da das Gleichgewicht – wenn überhaupt – auf Cellulosederivaten mit den Polyelektrolyten außerordentlich langsam erreicht wird, empfiehlt es sich, eine Durchlauf-

geschwindigkeit von etwa 3 bis 4 ml/h je cm² Querschnitt nicht zu überschreiten. Es gibt jedoch zwei limitierende Faktoren, nämlich die Diffusion, die die Zonen verbreitert, und die Empfindlichkeit gewisser Enzyme, welche verhindert, die Durchlaufgeschwindigkeit allzu stark zu reduzieren.

2. Um die beste Kontrolle des pH zu erreichen, hat BOMAN die sogenannten Pufferregeln vorgeschlagen. Wenn das pH durch einen Puffer eingestellt wird, der vom Austauscher gegen den Polyelektrolyt ausgetauscht wird (z. B. einen anionischen Puffer auf Anionenaustauschern), so führt dies zu einer mehr oder weniger großen Änderung des pH in der Säule, und dies gerade im Moment, in dem der Polyelektrolyt eluiert wird (Abb. 3). Es werden sich *tailing* und Artefakte einstellen. Etwas Ähnliches passiert natürlich bei der Chromatographie niedrigmolekularer Stoffe auch. Aber

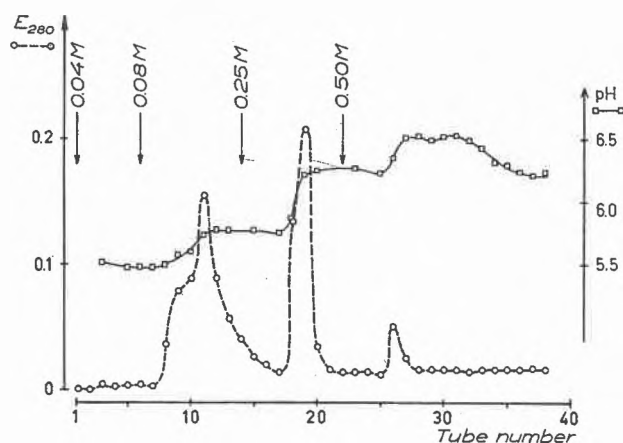


Abb. 3. Chromatographie von menschlichem Serumalbumin auf Dowex-2 [Acetat]. Stufenweise Elution mit Na-Acetat-Puffer, pH 5,4 (aus G. BOMAN und L. E. WESTLUND, *Arch. Biochem. Biophysics* 64 [1956] 217)

bei den Polyelektrolyten sind die pH-Änderungen besonders ausgeprägt, da in diesem Fall wegen der kleinen Kapazität des Austauschers das adsorbierte Gemisch einen beträchtlichen Teil der Kapazität der Säule beansprucht. Ferner weisen, wie ich oben erwähnt habe, gerade die Polyelektrolyte eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegen pH-Änderungen auf.

BOMAN empfiehlt also, kationische Puffer auf Anionenaustauschern und anionische Puffer auf Kationenaustauschern zu benutzen¹². Es steht eine Reihe anionischer Puffer zur Verfügung: Acetat, Succinat, Phosphat, Bicarbonat usw. Aber nur wenige sind die kationischen Puffer, die auf Anionenaustauschern bei relativ neutralen pH-Werten gebraucht werden können, d. h. unter den Bedingungen, die bei der Proteinchromatographie gewöhnlich bestehen. Der Puffer muß nämlich die folgenden Eigenschaften haben: 1. Er muß ein Kation sein, 2. gut wasserlöslich sein, 3. darf nicht mit Proteinen reagieren, 4. nicht mit dem Austauscher reagieren, 5. muß chemisch stabil sein, 6. darf Enzyme nicht hemmen und 7. nicht im UV bei 280 m μ absorbieren.

Die letzten zwei Bedingungen sind nicht unentbehrlich, da es möglich ist, den Puffer vor der Enzym- und Proteinbestimmung zu entfernen. Sie sind aber wichtig, wenn man – wie es oft der Fall ist – 50 bis 100 Fraktionen analysieren muß, und noch mehr, wenn das untersuchte Enzym wenig stabil ist. BOMAN hat das Puffersystem TRIS/HCl zwischen etwa pH 7,3 und 9 empfohlen. Wir versuchen jetzt den Puffer Piperazin/HCl oder Piperazin/Acetat für das pH-Gebiet zwischen 6,6 und 4,4⁴⁵.

Die Eigenschaften der zwei Puffersysteme sind verschieden. Das erste erlaubt Chromatographien bei neutralen oder leicht alkalischen pH-Werten, d. h. Chromatographien, die das gesamte Bild des Proteingemisches geben, weil bei diesen pH-Werten die meisten oder sogar alle Proteine adsorbiert werden. Das zweite System dagegen erlaubt, im pH-Bereich zu arbeiten, in dem die elektrischen Unterschiede der Proteine am größten sind, d. h. im Bereich der isoelektrischen Punkte. Man kann überdies, da bei saurem pH viele Proteine nicht adsorbiert werden, eine größere Menge des Gemisches durch die Säule durchlaufen lassen, wenn das untersuchte Protein unter diesen Bedingungen adsorbiert wird.

Diese beiden Puffersysteme ergänzen sich. Die Wahl ist durch die elektrischen Eigenschaften und die Stabilität des untersuchten Proteins bedingt.

Die anionischen Puffer sind also allgemein nicht zu empfehlen, wenn man mit Anionenaustauschern arbeitet. Besonders aber sind die zweiwertigen anionischen Puffer (wie z. B. die Phosphat-Puffer) auf Anionenaustauschern nicht zu brauchen.

Da das sekundäre Phosphat zwei Ladungen trägt, weist es eine größere Affinität für den Austauscher auf als das primäre Phosphat. Das Waschen mit Phosphatpuffern muß deshalb eine große Änderung des pH verursachen. Dieses Phänomen hat man auch experimentell nachgewiesen⁶¹. Als Folge sind die Resultate oft nicht reproduzierbar, und das Trennvermögen des Austauschers wird reduziert.

Es ist auch nicht zu empfehlen, pH-Gradienten im Titrationsbereich des Austauschers anzuwenden. Die Autoren, welche diese Prozedur angewandt haben, verfolgten das Ziel, die Kapazität des Austauschers progressiv zu reduzieren. Auf diese Weise sollten die adsorbierten Proteine in der Reihenfolge ihrer Affinität zum Austauscher eluiert werden. Es ist aber klar, daß jede pH-Änderung im Titrationsbereich des Austauschers nicht nur zu einem, sondern zu zwei Effekten führen muß, die einander entgegengesetzt sind. Überlegen wir, was geschieht, wenn während einer Proteinchromatographie auf DEAE-C das pH von 8,5 auf 10 erhöht wird. Die Affinität des Austauschers für die Proteine wird einerseits durch den verminderten Dissoziationsgrad der Gruppen der DEAE-C herabgesetzt; andererseits aber hat die Affinität der Proteine für den Anionenaustauscher die Tendenz, größer zu werden, weil durch die Alkalinisierung die Zahl der negativen Ladungen der Proteine erhöht wird. Als Folge dieser beiden entgegengesetzten Effekte muß man Artefakte erwarten oder im besten Fall eine Reduktion des Trennvermögens des Austauschers.

⁶¹ H. G. BOMAN, persönliche Mitteilung.

Es ist dagegen ohne weiteres erlaubt, einen pH -Gradienten außerhalb des Titrationsbereiches des Austauschers anzuwenden. Ich werde auf diesen Punkt zurückkommen.

Es ist klar, daß die Durchführung von Proteinchromatographien auch möglich ist, ohne alle diese Regeln zu befolgen. Solche Chromatographien wurden gemacht, und Trennungen wurden erhalten. Es handelte sich dabei meistens um Chromatographien, die bei pH -Werten durchgeführt worden sind, die ziemlich weit entfernt von den isoelektrischen Punkten der betreffenden Proteine lagen. Es ist klar, daß in diesen Fällen die genaue Kontrolle des pH -Wertes weniger kritisch ist. Auch wenn die Elution durch Senkung des pH erfolgt¹⁸⁻²², so dürfen die oben genannten Regeln weniger streng gehandhabt werden. In diesem Fall wird das chromatographische Verhalten der Proteine infolge Verminderung der Ladungen demjenigen niedrig-molekularer Substanzen ähnlich. Es sind aber genügend Fälle bekannt, wo es nicht gelang, Proteingemische erfolgreich und reproduzierbar zu chromatographieren. Solche Mißerfolge sind vor allem auf das Nichteinhalten einiger dieser Regeln zurückzuführen.

Die Elution

Bekanntlich kann man adsorbierte Substanzen durch drei grundsätzliche Methoden erfassen: durch Frontalanalyse, durch Elution oder Entwicklung, oder durch Verdrängung (*displacement*).

Die Frontalanalyse ist, soviel ich weiß, nicht weitgehend in der Polyelektrolytchromatographie angewandt worden*. Die Verdrängung wurde mit Sicherheit zum erstenmal von BOMAN nachgewiesen¹⁵. Wie er gezeigt hat, verläuft sie aber mit den Proteinen oft nicht ideal und ist oft von Austauschmechanismen begleitet¹³. In der folgenden Diskussion möchte ich deshalb die verschiedenen Elutionstypen in Klassen einteilen, je nach dem Parameter, der variiert wird, aber ohne auf Einzelheiten über den Mechanismus der Elution einzugehen (siehe auch¹⁶). Eine ausführliche Diskussion ist unnötig, nachdem die allgemeinen Regeln diskutiert wurden.

Hier muß ein weiterer Punkt erwähnt werden. Während der Elution darf man die Form des Austauschers nicht massiv ändern: z.B. nicht eine Säule, die in der Cl-Form vorliegt, mit Acetat waschen. Die Zone des eluierten Ions kann unvorherzusehende und unerwünschte Phänomene verursachen (wie z.B. Verdopplung homogener Zonen, Reduktion des Trennvermögens usw.).

Um die Elution zu erreichen, kann man 1. mit dem Anfangspuffer waschen, 2. die Konzentration des Elutionsmittels ändern, 3. das pH ändern, 4. selektiv die biochemische Affinität gewisser Proteine ausnützen. Oft ändert man zwei dieser Variablen. In diesem Fall muß man beachten, daß keine sich widersprechenden Effekte zustande kommen.

* Einige der seltenen Beispiele sind in³⁷ angegeben.

1. Entwicklung mit dem Anfangspuffer (*starting agent development*). Bei diesem Verfahren eluiert man die adsorbierten Proteine dadurch, daß man auf die Säule den gleichen Puffer gibt, mit welchem Säule und Gemisch ins Gleichgewicht gebracht wurden. Es besteht also kein prinzipieller Unterschied gegenüber der Chromatographie niedrigmolekularer Stoffe. Selbstverständlich arbeitet man in dem Bereich, in welchem das untersuchte Protein einen R_f -Wert hat, der weder sehr nahe bei 0 noch bei 1 liegt. In diesem Bereich ist, wie erwähnt der R_f -Wert außerordentlich empfindlich gegen Änderungen des pH , der Ionstärke und der Temperatur. Nach diesem Verfahren wurde die Chromatographie der RNase, des Insulins und anderer Stoffe durch die Gruppe von MOORE und STEIN durchgeführt⁴⁻⁷. Die Methode ist sehr geeignet, um die Einheitlichkeit eines Proteins zu beweisen. Sie gestattet z.B., die RNasen A und B voneinander zu trennen. Der größte Nachteil liegt darin, daß sie nur mit einzelnen, relativ einfachen Proteinen gute Resultate gibt.

2. Änderung der Konzentration des Elutionsmittels bei konstantem pH . Dies ist die Methode, die am meisten angewandt wird. Man kann die Konzentration des Elutionsmittels in einem Schritt (*one step*), stufenweise oder kontinuierlich zunehmen lassen.

Im *One-step*-Verfahren wäscht man die Säule unmittelbar nach der Adsorption mit einem Puffer von gleichem pH , aber höherer Konzentration (z.B. 0,5 oder 1 M TRIS/HCl-Puffer). Die einzelnen Proteinzonen folgen einander, von der steigenden Cl-Konzentration verdrängt, ohne daß leere Zwischenräume sie voneinander trennen (Abb. 4). Der Hauptmechanismus der Elution ist also die Verdrängung, die aber, wie erwähnt, oft nicht ideal ist. Dieser Elutionsmechanismus ist bei den

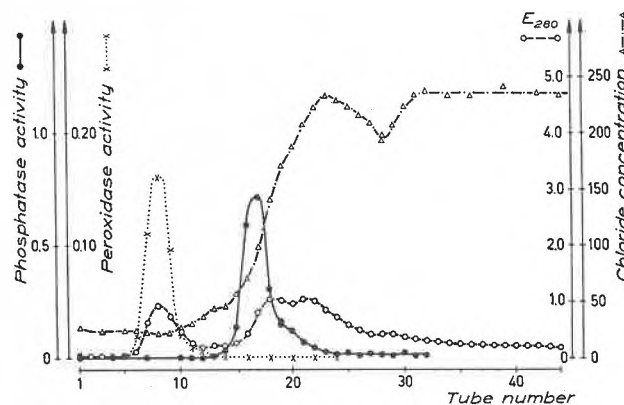


Abb. 4. *One-step*-Chromatographie von Meerrettich-Peroxydase und saure Phosphatase auf TEAE-C. TRIS-HCl-Puffer, pH 7,5 (0,02 → 0,25 M). Die Cl⁻-Konzentration ist als $\mu\text{Äq/ml}$ angegeben (aus G. BOMAN und L. E. WESTLUND, *Arch. Biochem. Biophysics* 70 [1957] 572)

Eiweißkörpern möglich, weil – soviel wir wissen – das chromatographische Verhalten der Proteine demjenigen der Substanzen entspricht, die stark nach unten gebogene Isotherme besitzen. Ein Vorteil dieses Mechanismus

ist, daß er zu kleineren *tailings* der Zonen führt. Die Prozedur ist schnell (das ist natürlich sehr wichtig im Fall von instabilen Proteinen) und sie erlaubt, viel größere Mengen Proteine zu trennen als andere Elutionsverfahren bei gleichem pH. Die Nachteile sind, daß sie mit schon weitgehend gereinigten Proteinen nicht erfolgreich ist (da die Träger [= *carriers*] fehlen) und daß sie oft weniger wirksam ist als die stufenweise Elution, weil – wie erwähnt – keine leeren Zwischenräume zwischen aufeinanderfolgenden Proteinfraktionen auftreten. Benachbarte Proteinzonen können sich deshalb bei nicht tadellos gepackten Säulen zum Teil überschneiden.

Ich habe früher schon erwähnt, daß, wenn am Anfang die Säule in gemischter OH-Carbonat-Cl-Form vorliegt, mit dieser Methode Artefakte zu erwarten sind. Die eluierten Fremdzonen können Verdopplung homogener Zonen verursachen. Dies ist in Betracht zu ziehen, wenn man z. B. beurteilen will, ob eine Enzymaktivität zu einem oder zwei Proteinmolekülen gehört.

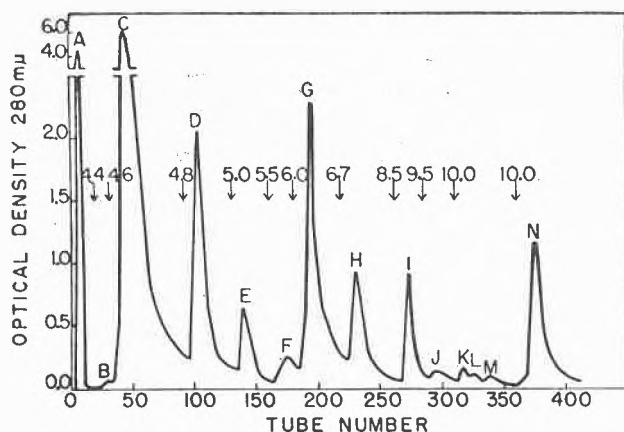


Abb. 5. Chromatographie von Hühnerweiß auf CM-C. Stufenweise Elution mit Puffern verschiedener pH-Werte. (Die Zahlen in der Figur bedeuten die pH-Werte der zugegebenen Puffer.) Ausgezogene Linie: E_{280} der Fraktionen; A: Ovomucoïd + Flavoprotein; C-E: Ovalbumine; F, I, J, K und M: Globuline; G und H: Conalbumin; L: Avidin; N: Lysozym (aus RHODES *et al.*, *J. Biol. Chem.* 230 [1958] 399)

Man kann die Konzentration des Elutionsmittels auch stufenweise zunehmen lassen. Bei jeder erreichten Elutionsmittelkonzentration wandern einige Proteine mit der Front des neuen Elutionsmittels und werden eluiert. Man hat also verschiedene Zonen, die durch Zwischenräume getrennt sind. Diese Methode wird sehr oft angewandt, weil es möglich ist, bei zweckmäßiger Wahl der Konzentrationen des Elutionsmittels eine vollkommene Trennung gewisser Komponenten des Gemisches zu erreichen (Abb. 2 und 5). Man muß sich aber immer bewußt sein, daß einerseits verschiedene Proteine in derselben Zone eluiert werden können – was selbstverständlich ist – und daß andererseits das gleiche Protein in verschiedenen benachbarten Zonen vorkommen kann. Man hat also einen großen Gipfel, dem kleinere Gipfel desselben Proteins vor- und nachlaufen. Nur die Rech-

romatographie erlaubt, zu beurteilen, ob jeder Gipfel ein unabhängiges Protein ist. Die Ursache dieses sehr häufigen Phänomens kann verschieden sein. Es ist möglich, daß der kleine Gipfel, der einem großen folgt, nichts anderes ist, als ein schmales *tailing*, das vom nächsten Elutionsmittel konzentriert worden ist. (Es sei hier wieder erwähnt, daß die Proteine stark gebogene Isotherme aufweisen.) Oder es kann sich um gegenseitige Verdrängung handeln: die Substanz A wird in Gegenwart von Substanz B, zusammen mit Substanz B

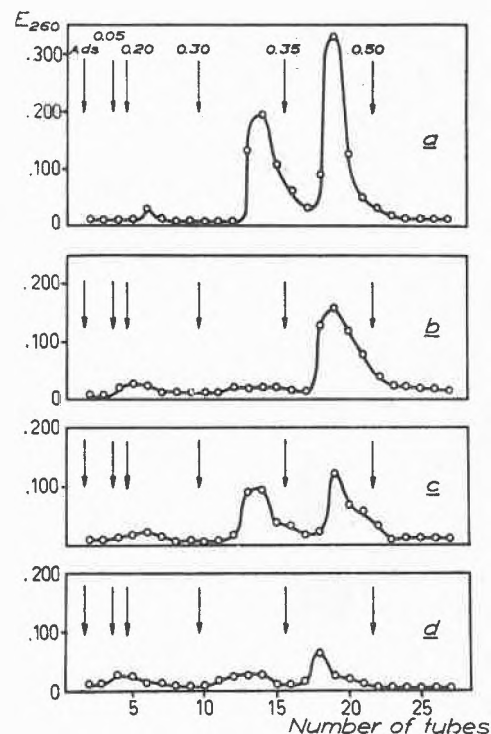


Abb. 6. a: Chromatographie von DNS auf Hydroxylapatit. Stufenweise Elution mit Phosphat-Puffern + 1 M NaCl, pH 6,8. Die Zahlen bedeuten die Molaritäten der Phosphat-Puffer. b: Rechromatographie der zweiten Fraktion vom Versuch a. c: Rechromatographie der ersten Fraktion vom Versuch a. d: Rechromatographie der ersten Fraktion vom Versuch c. Ausgezogene Linie: E_{260} (aus G. SEMENZA, *Ark. Kemi* 11 [1957] 89)

zum Teil eluiert, weil ihre Affinität für das Adsorbens durch die letztere verkleinert wird. Die dritte Ursache des Phänomens ist aber wahrscheinlich die häufigste: Bei jeder Änderung der Elutionsmittelkonzentration wird die Kapazität des Austauschers für das Protein herabgesetzt. Die Zone des Proteins, die am oberen Teil der Säule fixiert ist, wird deshalb breiter, und je höher die Konzentration des Elutionsmittels, desto breiter wird die Zone. Es kommt ein gewisser Moment, in welchem die Breite der Zone die Länge der Säule überschreitet. Ein Teil des adsorbierten Proteins wird dann überfließen. Endlich wird die Konzentration des Elutionsmittels erreicht, bei welcher das ganze Protein eluiert wird¹². Ein solcher Artefakt ist natürlich nicht für die Polyelektrolyte typisch. Die Erscheinung kann auch bei niedermolekularen Substanzen eintreten. Sie ist

aber bei den Polyelektrolyten häufiger, weil die Kapazität der Adsorbentien in diesem Fall besonders klein ist.

Ein weiterer Artefakt, der auch bei anderen Elutionstypen vorkommt, aber bei der stufenweisen Elution besonders deutlich ist, wird durch das folgende Beispiel illustriert: In dem in Abb. 6 dargestellten Versuch wurde DNS auf Hydroxylapatit chromatographiert⁵². Man erhält zwei Fraktionen: die eine (die zweite) ist stabil, wie aus der Rechromatographie klar hervorgeht, die andere hingegen (die erste) wird kontinuierlich in die zweite umgewandelt. Diese Umwandlung beruht scheinbar auf einer Veränderung der DNS, die während der

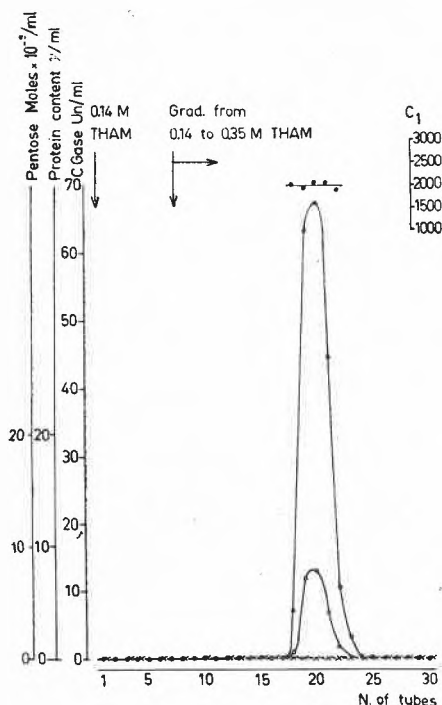


Abb. 7. Chromatographie von gereinigter Cysteinylglycine auf Dowex-2 [Cl], TRIS-HCl-Puffer, pH 7,3. Elution durch kontinuierliche Zunahme der Konzentration des Puffers. -----: Cysteinylglycine-Aktivität (CGase); -o-o-o-: Protein-Konzentration; -x-x-x-: RNS-Konzentration; THAM: Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan. Die spezifischen Aktivitäten der Fraktionen sind als proteolytische Koeffizienten (C_1) im oberen Teil der Abbildung angegeben (aus G. SEMENZA, *Biophysica Acta* 24 [1957] 401)

Chromatographie stattfindet (auch wenn sie nicht von der Chromatographie verursacht wird). Ein ähnliches Phänomen kann sich mit Proteinen auf Cellulosederivaten abspielen. Die Denaturierung eines homogenen Proteins kann z. B. solche Bilder verursachen.

Man kann auch die Konzentration des Elutionsmittels kontinuierlich zunehmen lassen (siehe Abb. 1). Es existieren zahlreiche Modifikationen des Verfahrens^{53,54,55}.

⁵² G. SEMENZA, *Ark. Kemi* 11 (1957) 89.

⁵³ R. S. ALM, R. J. P. WILLIAMS und A. TISELIUS, *Acta Chem. Scand.* 6 (1952) 826.

⁵⁴ B. DRAKE, *Ark. Kemi* 8 (1955) 1.

⁵⁵ E. A. PETERSON und H. A. SOBER, *Anal. Chem.* 31 (1959) 857. E. A. PETERSON und J. ROWLAND, *J. Chromatogr.*, im Druck (1960).

Jede hat in gewissen Fällen ihre Vorteile. Ein gemeinsamer Vorteil ist, daß das *tailing* reduziert wird, was bei Substanzen, die stark gekrümmte Isothermen besitzen, sehr wichtig sein kann⁵³. Dieses Verfahren ist deshalb sehr oft gebraucht worden^{18-21,33,34} usw. Man muß hier wieder erwähnen, daß die Gefahr, zwei Zonen aus einer einzigen Substanz zu erhalten, kleiner als bei der stufenweisen Elution, aber keineswegs ausgeschlossen ist. Solche Artefakte können auf gegenseitiger Verdrängung oder auf der Bildung von OH- und Bicarbonat-Zonen bei nicht vollständig regenerierten Säulen beruhen.

Die Elution durch kontinuierliche Konzentrationserhöhung des Elutionsmittels kann auch gebraucht werden, um die Einheitlichkeit eines Proteins zu prüfen (siehe Abb. 7)⁵⁶.

Wie man sieht, haben alle drei Verfahren Vor- und Nachteile. Die Wahl hängt hauptsächlich vom Zweck des Versuchs und von praktischen Überlegungen ab.

3. Die Elution läßt sich auch durch eine pH-Änderung durchführen (siehe Abb. 1 und 5). Auch in diesem Fall läßt sie sich auf die drei Arten erreichen, die ich oben aufgeführt habe. Wie schon erwähnt, darf man pH-Änderungen nicht im Titrationsbereich des Austauschers verwenden, und es ist wichtig, kationische Puffer auf Anionenaustauschern anzuwenden und umgekehrt. Aus diesen Gründen war früher der pH-Bereich für die Proteinchromatographie stark begrenzt. Auf DEAE-C und TEAE-C konnte man Proteine nur zwischen pH 7,3 (untere Grenze der Pufferwirkung des TRIS) und etwa pH 8,9 chromatographieren, da das pK' dieser Anionenaustauscher etwa 9,5 ist. Mit der von uns eingeführten GE-C ist die alkalische Grenze stark nach oben verschoben worden. Sie reicht theoretisch bis etwa pH 11. Die saure Grenze konnte mit Piperazin/HCl- oder Piperazin/Acetat-Puffern bis etwa 4,4 herabgesetzt werden. Es ist also möglich, z. B. Proteine im alkalischen Milieu zu adsorbieren und sie durch Verschiebung des pH ins saure Milieu zu eluieren, ohne daß die Elutionsmittelkonzentration (Cl^- oder Acetat) geändert wird, wobei immer nur kationische Puffer verwendet werden. Auf diese Weise erhält man eine Fraktionierung, die hauptsächlich durch die Lage der isoelektrischen Punkte bedingt ist und die natürlich mehr oder weniger einer Fraktionierung durch die Elektrophorese entspricht.

4. Schließlich ist es oft möglich, in der Chromatographie biochemisch-spezifische Mechanismen anzuwenden. Man kann z. B. die elektrische Ladung und damit die chromatographischen Eigenschaften eines Proteins selektiv ändern. Es ist bekannt, daß die meisten Substrate und kompetitiven Hemmstoffe der Enzyme Ionen sind. In Gegenwart von solchen Ionen muß also die Affinität des Enzyms zum Adsorbens eine andere sein als in ihrer Abwesenheit. Wir haben Versuche in dieser Richtung durchgeführt, welche bereits Hinweise auf die Hauptbedingungen gegeben haben⁴⁵. Es ist

⁵⁶ G. SEMENZA, *Biochim. Biophysica Acta* 24 (1957) 401.

klar, daß die Anwesenheit des Substrats allein nicht imstande ist, die Elution des Enzyms zu verursachen, weil die Substrate gewöhnlich nur eine oder zwei Ladungen besitzen. Da die Enzymproteine meistens eine große Zahl von Ladungen tragen, kann durch die Bindung des Substrats an das Fermentprotein keine wesentliche Änderung der elektrischen Eigenschaften des letzteren eintreten. Es ist auch wichtig, daß nur diejenigen Substrate gebraucht werden, die keine Interaktion mit den Ionenaustauschern aufweisen, sonst hat man eine partielle Änderung der Form des Austauschers und damit unerwünschte Änderungen des pH , der Ionstärke usw. Schließlich ist es wichtig, daß das Enzym sich auch unter den Bedingungen der Chromatographie (pH , Temperatur usw.) mit dem Substrat oder dem kompetitiven Hemmstoff verbindet. Wir haben schon verschiedene Enzyme auf diese Weise chromatographiert, und unsere Resultate zeigen, daß es möglich ist, nach diesem Prinzip Enzyme befriedigend zu chromatographieren.

MALMSTRÖM konnte vor wenigen Jahren die Enolase (ein Mg-aktiviertes Enzym) auf SM-C reinigen. Das Enzym wurde auf SM-C [Mg] adsorbiert und dann mit NaCl-Lösungen zusammen mit dem Mg eluiert⁵⁷. Es handelt sich also um ein besonderes Beispiel von «spezifischem» Ionenaustausch.

Weitere Beispiele «spezifischer» Cellulosederivate, die keine Ionenaustauscher *strictiori sensu* sind, habe ich oben erwähnt.

Anwendung auf biochemische Probleme

Der große Vorteil der Chromatographie zur Trennung und Reinigung von Enzymen und anderen Proteinen liegt im großen Trennvermögen und bei den hohen Ausbeuten, die für diese Technik typisch sind. Reinigung auf das 5- bis 100fache und Ausbeuten von 80 bis 100% sind häufig. Eine Begrenzung besteht für die Methode jedoch in der relativ niedrigen Kapazität der Adsorbentien. Bei Chromatographien mit stufenweiser Elution bei neutralen oder alkalischen pH -Werten trennt man gewöhnlich etwa 5 mg Protein je cm^3 feuchten Austauscher. Man kann aber in gewissen Fällen bis 100 mg je cm^3 erreichen, wie z. B. im Fall von Chromatographien in saurem Milieu, also unter Bedingungen, unter denen nur ein Teil der Proteine des Gemisches adsorbiert wird.

Für präparative Zwecke ist die Verwendung der Chromatographie somit hauptsächlich für die letzten Stufen der Reinigung angezeigt. In vielen Fällen ist es aber nicht unbedingt nötig, völlig reine Proteine zu gewinnen, um gewisse biochemische und biologische Probleme lösen zu können.

Oft stellt die Chromatographie zur Lösung solcher Probleme die geeignetste Methode dar. Einige Beispiele seien hier hervorgehoben.

Es wurde behauptet, daß das Biotin sowohl am «Malic Enzyme» als auch an der Oxalacetat-Carboxylase gebunden sei. Es ist uns gelungen, mit einer einzigen Chromatographie, die «Malic Enzyme»-Aktivität von dem im Extrakt enthaltenen Biotin vollkommen zu trennen. Im Fall der Oxalacetat-Carboxylase, die wir auf einer Avidino-azobenzyl-Cellulose chromatographiert haben, zeigte die Aktivität ein ganz anderes chromatographisches Verhalten als das im Extrakt enthaltene Biotin. Hier wäre das Problem im Fall der Oxalacetat-Carboxylase nur schwierig durch die Reindarstellung des Enzyms zu lösen gewesen, weil das Enzym während der Reinigung sehr instabil wird⁴⁰.

Ein zweites Beispiel: Vor einigen Jahren hat man behauptet, daß eine Dipeptidase, die Cysteinylglycinase, eine proteinfreie Ribonucleinsäure sei. Diese Behauptung war auf die chemischen Eigenschaften gegründet, die eine gereinigte Enzympräparation anscheinend aufwies.

Durch weitere chromatographische Reinigung des Enzyms auf DEAE-C ist es uns aber gelungen, die Enzymaktivität quantitativ von der Ribonucleinsäure zu trennen. Die auf diese Weise erhaltene Cysteinylglycinase zeigte alle chemischen Eigenschaften eines Proteins⁵⁶. Dieses Problem wäre wahrscheinlich ohne Chromatographie nicht zu lösen gewesen. Man hat Hinweise dafür, daß die Cysteinylglycinase im Extrakt als relativ stabiler Komplex, wahrscheinlich mit Ribonucleinsäure, vorkommt. Es ist fraglich, ob das aktive Protein und die Nucleinsäure sich durch andere Verfahren so vollständig hätten trennen lassen. Ich glaube, daß man die Chromatographie als beste Methode empfehlen kann, um Proteine von Nucleinsäuren quantitativ zu trennen.

Um die Existenz zweier verschiedener Aldolasen in der Leber nachzuweisen, hat man Proteinfractionen an DEAE-C⁵⁸ oder an AE-C⁵⁹ chromatographiert. Dabei tritt eine starke Verschiebung im Verhältnis der Aktivität gegen Fructose-1-phosphat und Fructose-1,6-Diphosphat ein. Dies ist ein indirekter Beweis, daß die beiden Enzymaktivitäten nicht am selben Enzymmolekül gebunden sind.

Um einen Eindruck von der Fülle der Möglichkeiten zu geben, habe ich in Tabelle 3 eine Reihe von in der Literatur beschriebenen Beispielen für Chromatographien an Cellulosederivaten zusammengestellt. Vollständigkeit wurde nicht angestrebt und wäre auch bei der außerordentlich raschen Verbreitung, die die Methode zurzeit erfährt, kaum zu erreichen. Übersichten von SOBER und PETERSON sind jetzt im Druck: H. A. SOBER und E. A. PETERSON, in *J. P. Greenstein Memorial Symposium*, herausgegeben von J. T. EDSALL, S. 61, New York 1960; E. A. PETERSON und H. A. SOBER, in *The Plasma Proteins*, herausgegeben von F. W. PUTNAM, Band I, S. 105, New York 1960; *id.* und *id.*, in *Biochemical Preparations*, herausgegeben von A. MEISTER, Band 8 (1960), im Druck; *id.* und *id.*, in *Methods in Enzymology*, herausgegeben von S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN, Band 5, New York 1960, im Druck.

⁵⁸ U. GMÜNDER-KALETTA, H. P. WOLF und F. LEUTHARDT, *Helv. Chim. Acta* 40 (1957) 1027.

⁵⁹ D. VISCHER, noch nicht veröffentlichte Versuche (1960).

⁵⁷ B. G. MALMSTRÖM, *Arch. Biophysics* 70 (1957) 58.

Tabelle 3. Einige Beispiele chromatographischer Anwendung von Cellulosederivaten

	Cellulosederivat	Literatur
<i>Plasma- und Serumproteine:</i> (Siderophilin, «Methämalbumin», Cöruoplasmin, Thrombin, Orosomucoid usw.)	DEAE-C	H. A. SOBER, F. J. GUTTER, M. M. WIJCKOFF und E. A. PETERSON, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 78 (1956) 756. H. A. SOBER und E. A. PETERSON, <i>Vox Sanguinis</i> 2 (1957) 62.
<i>id.</i> (Protein-gebundene Kohlenhydrate und Cholesterin, Siderophilin, Thyroxin-bindendes Protein, B ₁₂ -bindendes Protein, alkalische und saure Phosphatase, jodiniertes Albumin und Myeloma-Proteine)	DEAE-C	J. L. FAHEY, P. F. MCCOY und M. GOULIAN, <i>J. Clin. Invest.</i> 37 (1958) 272.
<i>id.</i> (Blutgruppen-Antikörper, Transferrin usw.)	DEAE-C	R. J. SPEER, M. D. PRAGER, T. F. KELLEY und J. M. HILL, <i>J. Lab. Clin. Med.</i> 54 (1959) 685.
<i>id.</i> (Patienten mit Myeloma oder akuter Leukämie)	DEAE-C	M. D. PRAGER, R. J. SPEER, J. M. HILL, J. WILLIAMS und M. GOERNER, <i>J. Lab. Clin. Med.</i> 54 (1959) 694.
<i>id.</i> (γ -Globuline, Siderophilin, Cöruoplasmin, M-Blutgruppe-Antikörper, andere Antikörper; Serum eines Patienten mit Chorionepitheliom)	DEAE-C	H. A. SOBER und E. A. PETERSON, <i>Fed. Proc.</i> 17 (1958) 1116.
<i>id.</i>	DEAE-C	H. GOODMAN, CH. DE VAUX-St-Cyr, H. CLEVE und P. GRABAR, <i>Die Proteide der biologischen Flüssigkeiten</i> , 8. Kolloquium, Sint Jans Hospital, Brügge (Belgien), Mai 1960, Zusammenfassung, S. 19.
<i>id.</i>	DEAE-C	K. B. COOKE, M. P. TOMBS, R. D. WESTON, F. SOUTER und N. F. MACLAGAN, <i>Chim. Clin. Acta</i> 4 (1959) 779.
<i>id.</i> (Hühnerserum)	DEAE-C	R. J. BLOCK, S. KELLER und D. W. MILLER, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 83 (1959) 426.
<i>id.</i> (Cöruoplasmin)	DEAE-C	B. E. SANDERS, O. P. MILLER und M. N. RICHARD, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 84 (1959) 60.
<i>id.</i>	DEAE-C	G. CURZON und L. VALLET, <i>Biochem. J.</i> 74 (1960) 279.
<i>id.</i> (α -Globuline)	DEAE-C CM-C	M. P. TOMBS und N. F. MACLAGAN, <i>Die Proteide der biologischen Flüssigkeiten</i> , 8. Kolloquium, Sint Jans Hospital, Brügge (Belgien), Mai 1960, Zusammenfassung, S. 42.
<i>id.</i> (γ -Globuline)	DEAE-C	J. L. FAHEY und A. P. HORBETT, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2645.
<i>id.</i> (<i>id.</i>)	DEAE-C	H. B. LEVY und H. A. SOBER, <i>Proc. Soc. Exper. Biol. Med.</i> 103 (1960) 250.
<i>id.</i> (Albumine)	DEAE-C	S. KELLER und R. J. BLOCK, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 85 (1959) 366.
<i>id.</i> (Reaginen)	DEAE-C	J. H. HUMPHREY und R. R. PORTER, <i>Lancet</i> 1 (4) (1957) 196.
<i>id.</i> (Patienten mit primär-chronischer Polyarthritits)	DEAE-C	J. LOSPALLUTO und M. ZIFF, <i>Proceedings of the International Congress on Rheumatic Disease, Toronto, Canada</i> , Juni 1957.
<i>id.</i> (<i>id.</i>) (Chymotrypsin-Hemmstoff)	DEAE-C	H. COKE, <i>Die Proteide der biologischen Flüssigkeiten</i> , 8. Kolloquium, Sint Jans Hospital, Brügge (Belgien), Mai 1960, Zusammenfassung, S. 12.
<i>id.</i> (Anti-diphtherie)	SM-C	J. PORATH, <i>Ark. Kemi</i> 11 (1957) 97.
<i>id.</i> (Antikörper)	Albumin-azobenzyl-C	D. H. CAMPBELL, E. LÜSCHER und L. S. LERMAN, <i>Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.</i> 37 (1951) 575.
<i>id.</i> (Plasminogen)	CM-C	J. J. HAGAN, F. B. ABLONDI und E. C. DE RENZO, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1005.
<i>id.</i> (Plasminogen)	DEAE-C	P. WALLÉN und K. BERGSTRÖM, <i>Acta Chem. Scand.</i> 13 (1959) 1464.
<i>id.</i> (Blutgerinnungsfaktoren: VII, IX, X und PPA)	DEAE-C	F. DUCKERT, E. T. YIN und W. STRAUB, <i>Die Proteide der biologischen Flüssigkeiten</i> , 8. Kolloquium, Sint Jans Hospital, Brügge (Belgien), Mai 1960, Zusammenfassung, S. 14.
<i>id.</i> (Antihämophyles Globulin)	DEAE-C	S. VAN CREVED, H. A. VEDER, C. N. PASCHA und W. F. KROEZE, <i>Thromb. Diath. Haemorr.</i> 3 (1959) 572.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Cellulosederivat	Literatur
<i>id.</i> (Fibrogen)	DEAE-C	M. D. PRAGER, R. J. SPEER und P. S. WORK, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 73.
«Fibrinopeptide»	DEAE-C	J. A. GLADNER, J. E. FOLK, K. LAKI und W. R. CARROLL, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 62.
<i>id.</i>	DEAE-C	V. NUSSENZWEIG, M. SELIGMANN und P. GRABAR, <i>Die Proteide der biologischen Flüssigkeiten</i> , 8. Kolloquium, Sint Jans Hospital, Brügge (Belgien), Mai 1960, Zusammenfassung, S. 33.
Serum-Haptoglobine	DEAE-C	R. KLUTHE und H. ISLIKER, <i>Helv. Physiol. Pharm. Acta</i> 18 (1960) 404.
Amino-oxydase aus Ochsen Serum	AE-C	G. SEMENZA, <i>Helv. Chim. Acta</i> 43 (1960) 1057.
<i>id.</i> (Folsäure-Vorstufe und «Plasmafaktor»)	TEAE-C DEAE-C	G. TONNIES und P. M. PHILLIPS, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2369.
Wachstumsfaktor aus Ochsen Serum	DEAE-C	I. LIEBERMAN und P. OVE, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 637.
Proteolytischer Hemmstoff aus Ochsen Serum	DEAR-C	J. L. GRAY, S. G. PRIEST, W. F. BLATT, U. WESTPHAL und H. JENSEN, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 56.
Trypsin-Hemmstoff aus Ochsen Serum	DEAE-C	F. C. WU und M. LASKOWSKI, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1680.
<i>Hormone:</i>		
Schafs-ACTH	Oxycellulose	I. J. GESCHWIND, J. O. PORATH und C. H. LI, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 74 (1952) 2121.
Schweins-«Corticotropin B»	Oxycellulose	J. W. RICHTER, D. E. AYER, A. W. BAZEMORE, N. G. BRINK und K. FOLKERS, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 75 (1953) 1952.
Schweins-ACTH	DEAE-C CM-C	T. H. FARMER, <i>Biochem. J.</i> 73 (1959) 321.
Schafs-Hypophysenvorderlappen-Hormone (FSH, LN, TSH, GH) und Proteinase I	DEAE-C	S. ELLIS, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 63.
Schafs-Hypophysenvorderlappen-FSH	DEAE-C	S. L. STEELMAN und A. SEGALOFF, <i>39th Meeting of the Endocrine Society</i> , New York, May 1957, Abstracts, S. 158.
Schafs-Hypophysenvorderlappen-Hormone (FSH, ICSH)	DEAE-C	M. C. WOODS und M. E. SIMPSON, <i>Fed. Proc.</i> 18 (1959) 173.
Schafs-Hypophysenvorderlappen GH	CM-C DEAE-C	S. ELLIS und M. E. SIMPSON, <i>J. Biol. Chem.</i> 220 (1956) 939.
Ochsen-Hypophysenvorderlappen-Hormone (TSH, LH)	DEAE-C CM-C	P. G. CONDLIFFE, R. W. BATES und R. M. FRAPS, <i>Biochem. Biophysica Acta</i> 34 (1959) 430.
Ochsen-Hypophysenvorderlappen-Hormone: TSH	CM-C	P. G. CONDLIFFE und R. W. BATES, <i>J. Biol. Chem.</i> 223 (1956) 843.
Ochsen-TSH	DEAE-C	M. E. CARSTEN und J. G. PIERCE, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 78.
<i>id.</i>	DEAE-C	P. G. CONDLIFFE, R. W. BATES, M. M. GARRISON und T. B. HOWARD, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 37 (1960) 150.
Ochsen-, Schafs- und Wals-TSH	DEAE-C TEAE-C	L. K. WYNSTON, C. A. FREE und J. G. PIERCE, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 85.
Menschliche Hypophysenvorderlappen-Hormone (FSH, ICSH)	DEAE-C	C. H. LI, P. G. SQUIRE und U. GRÖSCHEL, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 86 (1960) 110.
Schweins-Hypophysenhinterlappen-Hormone (β -MSH, Oxytocin, Vasopressin)	Oxycellulose SM-C TEAE-C DEAE-C	J. PORATH, <i>Zone Electrophoresis in Columns and Adsorption Chromatography on Ionic Cellulose Derivates as Methods for Peptide and Protein Fractinations</i> , Thesis, Uppsala 1957. Derselbe, <i>Ark. Kemi</i> 11 (1957) 259.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Cellulosederivat	Literatur
Neurophysin aus Schafs-Hypophysenhinterlappen	CM-C	J. CHAUVET, M. T. LENCI und R. ACHER, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 38 (1960) 266.
Ochsen-Parathormon	CM-C	S. FRIEDMAN und P. L. MUNSON, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 35 (1959) 509.
Insulin	DEAE-C	M. VOLINI und M. A. MITZ, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 334.
Secretin	CM-C	V. MUTT, <i>Acta Chem. Scand.</i> 13 (1959) 1247.
Menschliche Gonadotropine im Harn	DEAE-C	R. A. REISFELD, D. M. BERGENSTAL und R. HERTZ, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 81 (1959) 456.
<i>Gewebe-Extrakte, Enzyme und andere Proteine:</i>		
Hühnereiweiß (Ovomucoid, Flavoprotein, Ovalbumine, Globulin, Conalbumin, Avidin, Lysozym)	CM-C	M. B. RHODES, P. R. AZARI und R. E. FEENY, <i>J. Biol. Chem.</i> 230 (1958) 399.
Hühnereiweiß-Flavoprotein	DEAE-C CM-C	M. B. RHODES, N. BENNETT und R. E. FEENY, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2054.
<i>id.</i>	AE-C	G. SEMENZA, <i>Helv. Chim. Acta</i> 43 (1960) 1057.
Hühnereiweiß (Conalbumin)	CM-C	R. C. WOODWORTH und A. L. SCHADE, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 82 (1959) 78.
Trypsin- und Chymotrypsin-Hemmstoffe aus Hühnereiweiß	DEAE-C CM-C	M. B. RHODES, N. BENNETT und R. E. FEENY, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1686.
Acetyltrypsin	DEAE-C	I. E. LIENER, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 30 (1958) 252.
Acetyltrypsinogen	DEAE-C	I. E. LINER und T. VISWANATHA, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 36 (1959) 250.
Ochsen-Pancreassaft (Carboxypeptidase B, Chymotrypsinogen B, Procarboxypeptidasen A und B, DNase)	DEAE-C	P. J. KELLER, E. COHEN und H. NEURATH, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 344.
Procarboxypeptidase A	DEAE-C	P. J. KELLER, E. COHEN und N. NEURATH, <i>J. Biol. Chem.</i> 230 (1958) 905.
Procarboxypeptidase B aus Ochsenpancreas	DEAE-C	J. F. PECHÈRE, G. H. DIXON, R. H. MAYBURY und H. NEURATH, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 1364.
α -Chymotrypsinogen-Derivate	CM-C	D. M. ABADI und P. E. WILCOX, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 396.
Pancreas-Elastase und -Insulinase	DEAE-C	U. J. LEWIS und E. H. THIELE, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 79 (1957) 755.
RNase aus Schafspancreas	DEAE-C CM-C	S. E. ÅQVIST und C. B. ANFISEN, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 1112.
RNase (Ochsenpancreas)	CM-C	G. TABORSKY, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2652.
Phosphorilierte RNase	CM-C	G. TABORSKY, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2915.
RNase (red.-ox.)	CM-C	F. H. WHITE, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 333.
Adenosin-Deaminase aus Kalbs-Duodenalschleimhaut	DEAE-C	T. G. BRADY, <i>Die Proteide der biologischen Flüssigkeiten</i> , 8. Kolloquium, Sint Jans Hospital, Brügge (Belgien), Mai 1960, Zusammenfassung, S. 8.
Pepsinogen aus Schweinsmagenschleimhaut	DEAE-C	I. E. LIENER, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 37 (1960) 522.
Glykosidasen (Invertase, Maltase und Trehalase) aus Schweinsdarmschleimhaut	DEAE-C	B. BORGSTÖM und A. DAHLQVIST, <i>Acta Chem. Scand.</i> 12 (1958) 1997.
Invertase und Maltase aus Darmschleimhaut	TEAE-C	A. DAHLQVIST, <i>Acta Chem. Scand.</i> 13 (1959) 1817.
Proteasen aus Kaninchenmagensaft	DEAE-C	M. A. KARASEK, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 345.
Schweins-Parapepsinogen II	DEAE-C	A. P. RYLE, <i>Biochem. J.</i> 75 (1960) 145.
«Intrinsic Factor» aus Schweinsmagenschleimhaut	DEAE-C	L. ELLENBOGEN, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 332.
Schlangengift-Phosphodiesterase (<i>Crotalus adamanteus</i>)	CM-C	M. PRIVAT DE GARILHE und M. LASKOWSKI, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 18 (1955) 370.
Schlangengift (<i>Crotalus adamanteus</i>) (Phosphodiesterase, DNase, Lecithinase A, L-Aminosäure-Oxydase)	DEAE-C	H. G. BOMAN und U. KALETTA, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 24 (1957) 619; <i>Nature</i> 178 (1956) 1394.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Cellulosederivat	Literatur
Schlangengift (<i>Hemachatus hemachatus</i>) (Phosphodiesterase, DNase, Lecithinase A, Acetylcholinesterase)	DEAE-C	W. BJÖRK und H. G. BOMAN, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 34 (1959) 503.
Schlangengift-Phosphodiesterase (<i>Bothrops Arox</i>)	DEAE-C CM-C	F. FELIX, J. L. POTTER und M. LASKOWSKI, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1150.
Acetylcholinesterase aus Gehirn	Oxycellulose CM-C, SM-C DEAE-C	G. TOSCHI, <i>Rend. Ist. Super. Sanità</i> 21 (1958) 1.
Aldolasen aus Kaninchenleber	DEAE-C	U. KALETTA-GMÜNDER, H. P. WOLF und F. LEUTHARDT, <i>Helv. Chim. Acta</i> 40 (1957) 1027.
Saure Prostata-Phosphatase	DEAE-C	H. G. BOMAN, <i>Ark. Kemi</i> 12 (1958) 453.
Oxalacetatcarboxylase aus Hühnchenleber	DEAE-C Avidin- azobenzyl-C	G. SEMENZA, L. S. PRESTIDGE, D. MENARD-JECKER und M. BETTEX-GALLAND, <i>Helv. Chim. Acta</i> 42 (1959) 669.
«Malic Enzyme» aus Hühnchenleber	DEAE-C	<i>ibidem.</i>
Biotin-fixierendes System (aus Hühnchenleber)	AE-C	F. LEUTHARDT und A. GILGEN, in Vorbereitung.
Xantosinsäure-Aminase aus Taubenleber	DEAE-C	U. LAGERKVIST, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 143.
Renin aus Schweinsnieren	DEAE-C	G. T. PASSASANTI, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 34 (1959) 246.
Kathepsin D aus Ochsenmilz	DEAE-C CM-C, SM-C	E. M. PRESS, R. R. PORTER und J. CEBRA, <i>Biochem. J.</i> 74 (1960) 501.
Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase aus Rattenleber	DEAE-C	F. T. KENNEY, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2707.
Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber	DEAE-C	A. D. MERRITT und G. M. TOMKINS, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2778.
Proteinase I aus Hypophysenvorderlappen	DEAE-C	S. ELLIS, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1694.
Glutathion-synthetisierendes System	DEAE-C	H. M. BATES und F. LIPMAN, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) PC 22.
γ -Glutamylcystein-Synthetase	DEAE-C	D. H. STRUMEYER und K. BLOCH, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) PC 27.
UDPG-Pyrophosphorylase aus Kaninchenmuskel	DEAE-C	C. VILLAR-PALASI und J. LARNER, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 86 (1960) 61.
Milchsäure-Dehydrogenase aus Kaninchen-Cornea	DEAE-C	B. W. MOORE und B. WORTMAN, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 34 (1959) 260.
Milchsäure-Dehydrogenase verschiedener Organe	DEAE-C	B. HESS, <i>Europäisches Symposium über Medizinische Enzymologie</i> , Mailand, 28./29. März 1960.
Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber	CM-C	K. DALZIEL, <i>Acta Chem. Scand.</i> 12 (1958) 459.
L-Gulonsäure-Dehydrogenase aus Rattenleber	DEAE-C	Y. MANO, K. YAMADA, K. SUZUKU und N. SHIMAZONE, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 34 (1959) 563.
β -Hydroxypropinat-Dehydrogenase aus Schweinsnieren	DEAE-C	H. DEN, W. G. ROBINSON und M. J. COON, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 1666.
Kathepsin aus Ochsenmilz	DEAE-C	M. A. MITZ und S. S. YANARI, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 78 (1956) 2649.
Katalase aus Ochsenleber	DEAE-C	<i>ibidem.</i>
Rhodanese aus Ochsenmilz	DEAE-C	J. WESTLEY und J. R. GREEN, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2325.
Lactaldehyd-Reductase aus Schweinsnieren	DEAE-C	N. K. GUPTA und W. G. ROBINSON, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1609.
Schweinsnieren-Cysteinylglycinase	DEAE-C	G. SEMENZA, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 24 (1957) 401.
Schweinsnieren-Leucinamidase und Glycylglycinase	DEAE-C	A. T. MATHESON und C. S. HANES, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 33 (1959) 292.
Schweinsherz-G-A-Transaminase	CM-C	H. LIS, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 28 (1958) 191. H. A. SOBER und E. A. PETERSON, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 76 (1954) 1711.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Cellulosederivat	Literatur
Threonin-aktivierendes Enzym (aus Kalbsleber)	DEAE-C	G. ACS, G. HARTMANN, H. G. BOMAN und F. LIPMAN, <i>Fed. Proc.</i> 18 (1959) 178.
Enzyme aus Rattenleber (Aldolase, Isomerase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glucose-6-P-Dehydrogenase, 6-P-Gluconsäure-Dehydrogenase)	DEAE-C	B. W. MOORE, <i>Fed. Proc.</i> 18 (1959) 289.
Ferritin aus Rattenleber	DEAE-C	A. MAZUR, S. GREEN und A. CARLETON, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 595.
Extrakte aus Rattengeweiben (Proteine, Nucleinsäuren, Glucose-6-P-Dehydrogenase, 6-P-Gluconsäure-Dehydrogenase usw.)	DEAE-C	B. W. MOORE, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 331.
Rattenleber-Extrakte (nach Behandlung mit Azofarbstoffen)	CM-C DEAE-C	J. M. WHITCUTT, D. A. SUTTON und J. R. NUNN, <i>Biochem J.</i> 75 (1960) 557.
Transamidinase aus Schweinsnieren	AE-C GE-C	G. SEMENZA, <i>Helv. Chim. Acta</i> 43 (1960) 1057.
Milz-Phosphoprotein-Phosphatase	TEAE-C	J. A. GLOMSET, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 32 (1959) 349.
Leucin-aminopeptidase aus Schweinsnieren	DEAE-C	J. E. FOLK, J. A. GLADNER und T. VISWANATHA, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 36 (1959) 256.
Schweinenieren-Amidase	CM-C DEAE-C	H. A. SOBER und E. A. PETERSON, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 76 (1954) 1711.
Kalbsmilz (RNase, DNase, Kathepsine)	DEAE-C	H. A. SOBER und E. A. PETERSON, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 76 (1954) 1711.
Extrakte aus Krebszellen	DEAE-C	P. U. ANGELETTI, B. W. MOORE, S. SOLARIC und V. SUNTZEFF, <i>Proc. Soc. Exper. Biol. Med.</i> 103 (1960) 329.
DNase und RNase aus Milz	DEAE-C	M. E. MAVER und A. E. GRECO, <i>Fed. Proc.</i> 13 (1954) 261. M. E. MAVER, E. A. PETERSON, H. A. SOBER und A. GRECO, <i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i> 81 (1959) 599.
Prostata-Desoxyribonuclease	DEAE-C	H. G. BOMAN, <i>Ark. Kemi</i> 12 (1958) 467.
Xanthosinsäure-Glutamin-Amintransferase aus Kalbsthymus	DEAE-C	R. ABRAMS und M. BENTLEY, <i>Arch. Biochim. Biophysics</i> 79 (1959) 91.
Mevalonsäure-Kinase und «Decarboxylase»	DEAE-C	K. BLOCH, S. CHAYKIN, A. H. PHILLIPS und A. DE WAARD, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2595.
Tyrosinase aus Harding-Passey-Melanoma	DEAE-C	F. C. BROWN und D. N. WARD, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 77.
Froschleber-Carbamyl-phosphat-Synthetase	DEAE-C P-C	M. MARSHALL, R. L. METZENBERG und P. P. COHEN, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 102.
Vitamin-K ₁ -Reductase aus Hundeleber	DEAE-C	W. D. WOSILAIT, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1196.
Alanin-aktivierendes Enzym aus Rattenleber	DEAE-C	R. W. HOLLEY und J. GOLDSTEIN, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 1765.
Hypoxanthin-Dehydrogenase aus Hühnernieren	DEAE-C	E. J. LANDON und C. E. CARTER, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 819.
Phosphorylase aus menschlichem Muskel	DEAE-C	A. A. YUNIS, E. H. FISCHER und E. G. KREBS, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 260.
Carboanhydrase aus Ochsenerythrocyten	DEAE-C	S. LINDSKOG, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 39 (1960) 218.
Enzyme aus Erythrocyten (Enzyme der Glykolyse, des Horeckerschen Zyklus, Nucleosid-phosphorylase, TPNH-MetHb-Reductase, Glutathion-Reductase)	DEAE-C	M. A. HENNESSEY, A. M. HAFFNER und B. W. GABRIO, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 65.
Hämoglobine	CM-C	TH. J. HUISMAN, E. A. MARTIS und A. DOZY, <i>J. Lab. Clin. Med.</i> 52 (1958) 312.
id. und Derivate	CM-C	A. SAHA, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 32 (1959) 258.
id. von Mensch, Pferd und Hund	CM-C	F. J. GUTTER, E. A. PETERSON und H. A. SOBER, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 80 (1959) 353.
Blutgruppensubstanzen aus menschlichem Speichel	DEAE-C	H. BAER und U. RASMUSSEN, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 69.
Bence-Jones-Proteine	DEAE-C	B. JIRGENSONS, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 85 (1959) 89.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Cellulosederivat	Literatur
Harnproteine	DEAE-C	CH. DE VAUX-ST-CYR, H. CLEVE, H. GOODMAN und P. GRABAR, <i>Die Proteide der biologischen Flüssigkeiten</i> , 8. Kolloquium, Sint Jans Hospital, Brügge (Belgien), Mai 1960, Zusammenfassung, S. 13.
Collagen aus Rattenschwanz	CM-C	A. KESSLER, H. ROSEN und S. M. LEVERSON, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 989; <i>Nature</i> 184 (1959) 1640.
Collagen und Gelatine aus Kalbshaut	CM-C	K. A. PIEZ und E. WEISS, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 342. K. A. PIEZ, E. WEISS und M. S. LEWIS, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1987.
Muskelproteine (5'AMP-Desaminase, Tropomyosin, Y-Protein, Ribonucleoprotein usw.)	DEAE-C	S. V. PERRY und M. ZYDOWO, <i>Biochem. J.</i> 71 (1959) 220.
L-Myosin	DEAE-C	S. V. PERRY, <i>Biochem. J.</i> 74 (1960) 94.
Myosin A	DEAE-C	J. BRAHMS, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 81 (1959) 4997.
Myosin, L-Meromyosin, H-Meromyosin	DEAE-C	H. MUELLER und S. V. PERRY, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 40 (1960) 187.
L-Meromyosin	DEAE-C	A. G. SZENT-GYÖRGYI, C. COHEN und D. E. PHILPOTT, <i>J. Molecular Biol.</i> 2 (1960) 133.
Myosin aus Hühnerembryo	DEAE-C	D. S. LOVE, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 256.
Ribonucleoprotein aus Muskel	DEAE-C ECTEOLA-C	S. V. PERRY und M. ZYDOWO, <i>Biochem. J.</i> 72 (1959) 682.
Kernextrakte	DEAE-C	S. M. AMER und H. BUSCH, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 339.
id.	CM-C	J. R. DAVIES und H. BUSCH, <i>Cancer Res.</i> 19 (1959) 1157.
Kalbsthymus-Histone	CM-C	P. F. DAVISON, <i>Biochem. J.</i> 66 (1957) 708.
id.	P-C	G. L. BROWN und A. V. BROWN, <i>Symp. Soc. Exper. Biol.</i> 12 (1958) 6.
id.	CM-C	D. M. P. PHILLIPS und E. W. JOHNS, <i>Biochem. J.</i> 72 (1959) 538.
Überstehendes von Rattenleber (Phosphoproteine)	TEAE-C ECTEOLA-C SM-C	J. GLOMSET, <i>Acta Chem. Scand.</i> 11 (1957) 512.
id.	TEAE-C	J. GLOMSET, <i>Acta Chem. Scand.</i> 12 (1958) 641.
<i>E. coli</i> -Extrakte (Glucose-6-P-dehydrogenase, Phosphoglucomutase, β -Galactosidase usw.)	DEAE-C	D. B. COWIE, G. H. COHEN, E. T. BOLTON und H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 34 (1959) 39.
<i>E. coli</i> -DNS-Polymerase	DEAE-C	I. R. LEHMAN, M. J. BESSMAN, E. S. SIMMS und A. KORNBERG, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 163.
D-Mannonsäure-Dehydrogenase aus <i>E. coli</i>	DEAE-C	J. D. SMILEY und G. ASHWELL, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1571.
2-Keto-3-Desoxy-D-Glucono-Kinase aus <i>E. coli</i>	DEAE-C	M. A. CYNKIN und G. ASHWELL, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1576.
Alkalische Phosphatase aus <i>E. coli</i>	DEAE-C	A. GAREN und C. LEVINTHAL, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 38 (1960) 470.
Galactose-1-P-Uridyl-Transferase aus <i>E. coli</i>	DEAE-C	K. KURAHASHI und A. SUGIMURA, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 940.
β -Galactosidase aus <i>E. coli</i>	DEAE-C	A. S. L. HU, R. G. WOLFE und F. J. REITHEL, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 81 (1959) 500.
Glutaminsäure-Decarboxylase aus <i>E. coli</i>	DEAE-C	R. SHUKUYA und G. W. SCHWERT, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1649.
Hefe-Enolase	SM-C	B. G. MALMSTRÖM, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 70 (1957) 58.
Milchsäure-Dehydrogenase aus Hefe	DEAE-C	A. P. NYGAARD, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 35 (1959) 212.
Isocitronensäure-lyase aus Hefe	DEAE-C	J. A. OLSON, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 5.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Cellulosederivat	Literatur
Malat-synthetase aus Hefe	DEAE-C	G. H. DIXON, H. L. KORNBERG und P. LUND, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 41 (1960) 217.
β -Galactosidase aus Hefe	DEAE-C	J. D. DUERKSEN und H. HALVORSON, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 1113.
UDPGal-4'-Epimerase aus Hefe	DEAE-C	E. S. MAXWELL und H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 308.
Succino-AICAR-spaltendes Ferment (Adenylo-succinase) aus Hefe	DEAE-C	R. W. MILLER, L. N. LUKENS und J. M. BUCHANAN, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 1806.
Protein-phosphokinase aus Hefe	DEAE-C	M. RABINOWITZ und F. LIPMAN, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1043.
O-Phosphoserin-Phosphatase aus Hefe	DEAE-C	M. SCHRAMM, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 1169.
Häm-Proteine aus Chromatium	DEAE-C	R. G. BARTSCH und M. D. KAMEN, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 825.
Katalase aus <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	DEAE-C	R. K. CLAYTON, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 36 (1959) 40.
Cytochrom C aus <i>Rhodospirillum rubrum</i>	CM-C	S. PALÉUS und H. TUPPY, <i>Acta Chem. Scand.</i> 13 (1959) 641.
Chloroperoxydase aus <i>Caldariomyces fumago</i>	DEAE-C	P. SHAW und J. BECKWITH, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 47.
Glucono- δ -Lactonase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	DEAE-C	M. A. JERMYN, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 37 (1960) 78.
Polyphenol-oxydase aus Pilzen	Verschiedene Phenol-azobenzyl-C	L. S. LERMAN, <i>Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.</i> 39 (1953) 232.
<i>id.</i>	DEAE-C	E. FRIEDEN und M. OTTESEN, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 34 (1959) 248.
D- und L-Milchsäure-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus plantarum</i>	DEAE-C	D. DENNIS und N. O. KAPLAN, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 810.
L-Milchsäure-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus arabinosus</i>	DEAE-C	A. M. SNOSWELL, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 35 (1959) 574.
Phosphotransbutyrylase aus <i>Clostridium butyricum</i>	DEAE-C	R. C. VALENTINE und R. S. WOLFE, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1948.
Threonin-Synthetase aus <i>Neurospora crassa</i>	DEAE-C	M. FLAVIN und C. SLAUGHTER, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1103.
20 β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase aus <i>Streptomyces hydrogenans</i>	DEAE-C	H. J. HÜBENER, F. G. SAHRHOLZ, J. SCHMIDT-THOMÉ, G. NESEMANN und R. JUNK, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 35 (1959) 270.
Phosphoarabinose-Isomerase aus <i>Propionibacterium pentosaceum</i>	DEAE-C	W. A. VOLK, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 1550.
Formiat-aktivierendes Ferment aus <i>Micrococcus aerogenes</i>	DEAE-C	H. R. WHITELEY, M. J. OSBORN und F. M. HUENNEKENS, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 1538.
Collagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i>	DEAE-C	N. H. GRANT und H. E. ALBURN, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 82 (1959) 245.
Glutaminsäure-Racemase aus <i>Lactobacillus arabinosus</i>	DEAE-C	L. GLASER, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 2095.
Amyloglucosidase aus <i>Aspergillus niger</i>	DEAE-C	J. H. PAZUR und T. ANDO, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 1966.
UDP-Acetylglucosamin-4'-Epimerase aus <i>Bacillus subtilis</i>	DEAE-C	L. GLASER, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 2801.
Trehalase aus <i>Phormia regina</i>	DEAE-C	S. FRIEDMAN, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 87 (1960) 252.
Meerrettich (Peroxydase und saure Phosphatase)	TEAE-C	H. G. BOMAN und L. E. WESTLUND, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 70 (1957) 572.
Meerrettich-Peroxydase	CM-C	K. G. PAUL, <i>Acta Chem. Scand.</i> 12 (1958) 1312.
Elastase (aus Ficin-Präparationen)	CM-C	J. THOMAS und S. M. PARTRIDGE, <i>Biochem. J.</i> 74 (1960) 600.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Cellulosederivat	Literatur
Erlenpollen-Allergene	DEAE-C SM-C	S. HERBERTSON, J. PORATH und H. COLLEDAHL, <i>Acta Chem. Scand.</i> 12 (1958) 737.
Hämagglutinin aus Soyabohnen	DEAE-C	S. WADA, M. J. PALLANSCH und I. E. LIENER, <i>J. Biol. Chem.</i> 233 (1958) 395.
<i>Viren:</i>		
Tabak-Mosaik-Virus	ECTEOLA-C	B. COMMONER, J. A. LIPPINCOTT, G. B. SHEARER, E. E. RICHMAN und J. WU, <i>Nature</i> 178 (1956) 767.
<i>id.</i>	CM-C	G. W. COCHRAN, J. L. CHIDESTER und D. L. STOCKS, <i>Nature</i> 180 (1957) 1281.
<i>id.</i>	DEAE-C	Ö. LEVIN, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 78 (1958) 33.
<i>id.</i>	ECTEOLA-C	P. VON TAVEL, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 85 (1959) 491.
X-Virus der Kartoffel	DEAE-C	Ö. LEVIN, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 78 (1958) 33.
ECHO-Virus, Coxsackie-Virus, Coloradofieber-Virus	ECTEOLA-C	B. H. HOYER, E. T. BOLTON, R. A. ORMSBEE, G. LEBOUVIER, D. B. RITTER und C. L. LARSON, <i>Science</i> 127 (1958) 859.
Q-Fieber-Rickettsiae	ECTEOLA-C	<i>ibidem.</i>
Polio-Virus	ECTEOLA-C DEAE-C	<i>ibidem.</i>
Polio-Virus	ECTEOLA-C CM-C	R. A. ORMSBEE und B. H. HOYER, <i>Fed. Proc.</i> 17 (1958) 529.
Virus-Vakzine	ECTEOLA-C	B. H. HOYER, R. A. ORMSBEE, E. BOLTON und D. B. RITTER, <i>Fed. Proc.</i> 17 (1958) 517.
Bacteriophagen T1, T2 und T2r	ECTEOLA-C	A. TAUSSIG und E. H. CREASER, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 24 (1957) 448. E. H. CREASER und A. TAUSSIG, <i>Virology</i> 4 (1957) 200.
<i>Nucleinsäuren und Derivate:</i>		
DNS aus T2r-Bacteriophagen	Histone- azobenzyl- cellulose	G. L. BROWN und A. V. MARTIN, <i>Nature</i> 176 (1955) 971. G. L. BROWN und A. V. BROWN, <i>Symp. Soc. Exper. Biol.</i> 12 (1958) 6.
DNS aus verschiedenen Geweben	ECTEOLA-C	A. BENDICH <i>et al.</i> , <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 77 (1955) 3671, 80 (1958) 3949; <i>Symp. Soc. Exper. Biol.</i> 12 (1958) 31 und viele andere Arbeiten.
DNS	ECTEOLA-C	N. KONDO und S. OSAWA, <i>Nature</i> 183 (1959) 1602.
DNS	ECTEOLA-C	S. KIT, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 87 (1960) 318, 330.
Oligodesoxynucleotide (aus DNase-Hydrolysat)	ECTEOLA-C	L. ASTRACHAN und E. VOLKIN, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 79 (1957) 130.
Thymidin-Oligonucleotide	DEAE-C ECTEOLA-C	G. M. TENER, H. G. KHORANA, R. MARKHAM und E. H. POL, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 80 (1958) 6223.
RNS	ECTEOLA-C	D. F. BRADLEY und A. RICH, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 78 (1956) 5898.
RNS (aus Kaninchenmuskel)	ECTEOLA-C	E. MIHALYI, D. F. BRADLEY und M. I. KNOLLEN, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 79 (1957) 6387.
RNS (aus Rattenleber)	ECTEOLA-C	D. A. GOLDTHWAIT, <i>J. Biol. Chem.</i> 234 (1959) 3245.
RNS (aus Hefe)	ECTEOLA-C	J. STARR und D. GOLDTHWAIT, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 317. D. A. GOLDTHWAIT und J. L. STARR, <i>J. Biol. Chem.</i> 235 (1960) 2025.
RNS und DNS aus <i>E. coli</i> , <i>B. megatherium</i> und <i>M. pyogenes</i>	ECTEOLA-C	A. TAUSSIG und E. H. CREASER, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 83 (1959) 436.
Oligonucleotide aus RNase-Hydrolysat	ECTEOLA-C	K. TANAKA, <i>Bull. Chem. Soc. Japan</i> 31 (1958) 393.
<i>id.</i> und Polyadenylsäuren	DEAE-C	M. STAEHELIN, E. A. PETERSON und H. A. SOBER, <i>Arch. Biochem. Biophysics</i> 85 (1959) 289; <i>Biochim. Biophysica Acta</i> , im Druck.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	Cellulosederivat	Literatur
Flavinnucleotide	DEAE-C	J. G. MOFFAT und H. G. KHORANA, <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> 80 (1958) 3756.
Freie Nucleotide	ECTEOLA-C	E. D. KORN, <i>Biochim. Biophysica Acta</i> 32 (1959) 554.
id. aus Rattenleber	TEAE-C	J. GLOMSET, <i>Acta Chem. Scand.</i> 12 (1958) 641.
Sulfat-Nucleotide	ECTEOLA-C	N. R. RINGERTZ und P. REICHARD, <i>Acta Chem. Scand.</i> 13 (1959) 1467.
<i>Polysaccharide:</i>		
Dextrin, Araban, Pektinsäure, Arabinoxylan, Mehlpolysaccharide, Glykogen	DEAE-C	H. NEUKOM, H. DEUEL, W. J. HERI und W. KÜNDIG, <i>Helv. Chim. Acta</i> 43 (1960) 64.
Bodenpolysaccharide	DEAE-C	M. MÜLLER, N. C. METHA und H. DEUEL, <i>Z. Pflanzernähr. Düng. Bodenkde.</i> 90 (1960) 139.
Heparin, β -Heparin, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfonsäure	ECTEOLA-C	N. R. RINGERTZ und P. REICHARD, <i>Acta Chem. Scand.</i> 13 (1959) 1467.
<i>Varia:</i>		
Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin	P-C	G. ROUSER, A. J. BAUMAN, J. O'BRIEN und D. HELLER, <i>Fed. Proc.</i> 19 (1960) 233.
Folsäure-Derivate	TEAE-C	E. USDIN und J. PORATH, <i>Ark. Kemi</i> 11 (1957) 41.