

Separation of Rh Antibodies by Ion Exchange Chromatography

N. M. ABELSON

Philadelphia, Pennsylvania, USA

Abstract

Various methods have been used for separating and characterizing anti-Rh agglutinins, but there is no general agreement as to the chemical nature of the antibodies involved. Antisera from individuals in various stages of Rh immunization have been separated on cellulose anion and cation exchange columns. Early or saline agglutinins are separable from late or albumin agglutinins and are associated with a fast moving gamma-globulin. Albumin agglutinins are associated with a globulin fraction of slower mobility. Hyperimmune antibodies displaying zones in protein media are separable into two components, a fast moving fraction and a very slowly moving fraction. The latter has been found to inhibit agglutination in protein media and to be detected poorly by Coombs tests. Addition of certain human sera, however, will disclose the presence of the antibody on coated red cells.

The clinical applications of these observations will be discussed.

Elektrophoretische Untersuchung des Hämagglutinins Anti-N von *Vicia graminea*

F. OTTENSOOSER UND G. HÖXTER

São Paulo, Brasilien

Einige pflanzliche Hämagglutinine sind zweifellos Proteine. Das unspezifische Hämagglutinin von *Phaseolus vulgaris* hat sich indessen als Glykoprotein erwiesen^{3,4,5}. Seine Wirksamkeit wird übrigens durch Entfernung des Zuckers erhöht, vielleicht durch Freisetzung von Gruppen, die mit den Blutkörperchen-Polysacchariden reagieren. Spezifische Pflanzenantikörper sind nur für vier mensch-

liche Blutfaktoren bekannt, nämlich für A, B, O und N. Nach *Renkonen*³ dürfte Anti-A von *Vicia cracca*, das 30 % Kohlehydrat enthält, ebenfalls ein Glykoprotein sein. Bei Papierelektrophorese^{1,3} fand sich das Agglutinin in einer einzigen Eiweißfraktion, deren Geschwindigkeit zwischen der des γ - und β -Globulins des menschlichen Serums liegt.

Wir analysierten Anti-N von *Vicia graminea*, dessen Entdeckung vor fünf Jahren auf dem Internationalen Mikrobiologenkongress, hier in Rom, mitgeteilt wurde². Die Samen kamen zum Teil frisch vom Ursprungsort in Südbrasilien, zum Teil wurden sie von solchen Samen ausgehend in São Paulo geerntet. Die, wie üblich, aus Samenpulver mit 10 Teilen physiologischer Kochsalzlösung gewonnenen Extrakte enthielten rund 0,6 % Eiweiß und gaben mit N- und MN-Blutkörperchen Titer zwischen 20 und 60.

Die Elektrophorese der Extrakte wurde auf Papier Whatman Nr. 1 bei 10 Volt/cm in Veronalpuffer vom pH 8,6 während 3 Stunden durchgeführt. Die Papierstreifen wurden längsgesteilt, und die eine Hälfte wurde auf Eiweiß mit Amidoschwarz, auf Kohlehydrat mit PAS und auf Fett mit Sudanschwarz gefärbt.

Die andere Hälfte wurde, den Eiweißfraktionen entsprechend, in Teile zerschnitten, die mit physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von verdünnter Essigsäure extrahiert wurden. Bei Auswertung der verschiedenen Teile der Papierstreifen war das Agglutinin Anti-N in einer einheitlichen Eiweißfraktion nachzuweisen, die durchschnittlich $\frac{2}{3}$ der angewandten Eiweißmenge ausmachte. Daraus ließ sich ungefähr $\frac{1}{3}$ der anfänglichen Antikörper-Aktivität wiedergewinnen.

Neben dieser spezifischen Eiweißfraktion sind eine schnellere und zwei langsamere vorhanden. Die langsamste reagiert unspezifisch, nämlich auch mit Blutkörperchen M. Die beiden anderen Fraktionen reagieren negativ, wonach ihr Antikörpergehalt mindestens 8mal geringer ist als der der spezifischen Fraktion.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der spezifischen Fraktion liegt zwischen der des γ - und β -Globulins des Menschenerserums, ebenso wie bei Anti-A aus *Vicia cracca*. Während dieses jedoch ein Glykoprotein zu sein scheint, findet sich in der spezifischen Fraktion des pflanzlichen Anti-N Zucker nicht oder nur in Spuren. Auch die Reaktion auf Fett war negativ. Wie unspezifische, so kommen also auch spezifische pflanzliche Agglutinine in Form von Proteinen und von Glykoproteiden vor.

Summary

Seed powder from *Vicia graminea* extracted with 10 parts of saline yielded a 0.6 per cent protein solution. After paper electrophoresis the Anti-N hemagglutinin was found in a single protein fraction which contained $\frac{2}{3}$ of the total protein, and 25–50 per cent of the applied antibody. Three further fractions were present, one faster and two slower ones: the slowest reacted non-specifically, agglutinating also M cells; the other two were devoid of activity.

The mobility of the specific fraction lies between that of the human γ - and β -globulins, resembling the electrophoretic behaviour of the plant anti-A from *Vicia cracca*. Contrary to that anti-A which contains 30 per cent carbohydrate and appears to be a glycoprotein, the specific fraction of plant anti-N shows only traces of sugar if any. Thus, the non-specific as well as the specific plant hemagglutinins occur in both forms: as pure proteins and as glycoproteins.

Literaturverzeichnis

1. *Krüpe, M.*: Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper (Phyttagglutinine) (Enke, Stuttgart 1956).
2. *Ottenssooser, F.* und *Silberschmidt, K.*: Hemagglutinin anti-N in plant seeds. Atti 6. Congr. int. Microbiol., Roma 1953, vol. 2, Sez. VI-VII, pp. 313-314; Nature, Lond. 172: 914-915 (1953).
3. *Renkonen, K. O.*: Studies on the nature of hemagglutinins present in seeds. Ann. Med. exp. Fenn. 28: 45-51 (1950).
4. *Rigas, D. A.* und *Osgood, E. E.*: Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. J. biol. Chem. 212: 607-615 (1955).
5. *Saint-Paul, M.*; *Daoulas-Le Bourdellès, F.* et *Fine, J. M.*: Contribution à l'étude biochimique de l'hémagglutinine de *Phaseolus vulgaris*. C. R. Soc. Biol. 150: 1742-1744 (1956).

154

Presence of Properdin in a Fraction I Preparation

R. CONTE MAROTTA, E. ROMANO, I. DI TOMMANO AND S. JORIO
Naples, Italy

Abstract

The properdin and antihemophilic activities have been determined for a Fraction I preparation obtained by slightly changing the precipitation conditions described by *Cohn* in his method 6. In particular, the pH was carefully kept at 6.8-6.9.