

MÉTHODE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE D'ANALYSE DE MÉLANGES DE SUBSTANCES ANTIGÉNIQUES

par

PIERRE GRABAR ET CURTIS A. WILLIAMS JR*,

avec l'aide technique de

MME J. COURCON

Service de Chimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris (France)

Dans un note préliminaire¹ nous avons décrit le principe d'une méthode qui permet d'effectuer sur un même petit échantillon une séparation électrophorétique et des réactions immunochimiques. Depuis la publication de cette note, de nombreuses expériences effectuées avec cette méthode nous ont amené à réaliser quelques perfectionnements et nous ont permis de nous rendre compte de son utilité dans l'étude de mélanges naturels de protéines et, éventuellement, de polyosides.

L'un de nous a déjà insisté, dans une monographie², sur l'intérêt que présente pour l'étude de l'homogénéité de préparations de protéines, l'emploi d'au moins deux méthodes basées sur des propriétés distinctes de ces protéines.

C'est ainsi, par exemple, que dans le sérum sanguin, grâce à l'électrophorèse de Tisélius on a pu distinguer d'abord quatre groupes de protéines (albumines, α , β , et γ -globulines), puis plusieurs sous-groupes. Enfin, on sait que ces sous-groupes eux-mêmes peuvent renfermer plusieurs protéines différentes, puisqu'on peut y distinguer des activités différentes (enzymatiques, anticorps, etc.) ou des complexes (avec des métaux, des lipides, etc.).

Pour mettre en évidence entre deux protéines des différences, même très légères, les réactions immunochimiques présentent un intérêt particulier, car leur sensibilité et leur spécificité sont bien plus grandes que celles de la très grande majorité des réactions chimiques ou des mesures physiques. C'est pourquoi les méthodes immunochimiques ont été depuis longtemps mises en oeuvre pour l'identification des protéines, mais c'est surtout grâce aux études quantitatives sur les réactions antigène-anticorps de l'école de Heidelberger qu'elles sont entrées dans l'usage courant³. Au cours de ces dernières années des techniques basées sur la précipitation spécifique en milieu gélifié^{4,5,6,7} ont été décrites. Ces techniques permettent le dénombrement et dans certaines conditions la comparaison directe⁵ des différents constituants d'un mélange. Cependant, lorsqu'on veut définir un constituant décelé par une méthode immunochimique, on rencontre des difficultés, à moins de posséder des échantillons de corps purs. Ainsi, lorsqu'on a essayé de comparer, par la méthode d'OUCHTERLONY, des fractions des protéides du sérum obtenues par relargage ou par précipitation à l'alcool, on a pu identifier certaines lignes de précipitation grâce à des échantillons assez purs, tandis que les autres ne pouvaient pas être définies⁸. Dans un travail plus récent, OUDIN⁹ utilisant sa technique en tubes

* Boursier de la Fondation française Waksman en 1952/53 et du United States Public Health Service en 1953/54. Adresse actuelle: Carlsberg Laboratorium. Copenhague. Danemark. Une partie de ce travail a figuré dans sa thèse de Doctorat (Ph. D) de l'Université Rutgers, États-Unis d'Amérique.

et également des fractions obtenues par relargage s'est heurté à la même difficulté. Or, il est évident qu'une définition par une propriété physique, comme par exemple la mobilité électrophorétique, est plus avantageuse qu'un nom donné à la suite d'un fractionnement quelconque.

C'est pour pallier cet inconvénient que nous avons cherché à mettre au point une méthode qui permet de définir les constituants d'un mélange par leur vitesse de migration électrophorétique et de les mettre en évidence par la réaction de précipitation spécifique à l'aide d'immunsérum convenables. Cette méthode consiste à effectuer une électrophorèse du mélange dans un gel de gélose et à faire diffuser ensuite, perpendiculairement à l'axe de migration électrophorétique l'immunsérum. Chaque constituant donnant une fine bande de précipité avec l'anticorps correspondant, on peut le définir par son emplacement sur l'axe de migration, tandis que le nombre de lignes de précipitation permet de savoir le nombre minimum de composants du mélange initial.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Quatre étapes peuvent être distinguées: préparation des plaques de gélose dans lesquelles on introduit le produit à analyser; électrophorèse dans la gélose; réaction de précipitation spécifique; enregistrement des résultats.

Préparation des gels

(a) *La gélose et sa purification.* Il est évident que la gélose choisie doit fournir d'une part des gels constants, et ceci à des concentrations aussi basses que possible, et, d'autre part, des gels translucides. Il faut donc utiliser des géoses purifiées et n'ayant pas été trop dégradées, par exemple de nombreux chauffages, et préparer d'avance une certaine quantité de gélose afin d'éviter de légères variations des propriétés de la gélose d'une préparation à une autre.

Pratiquement, nous procémons de la manière suivante. Quand nous partons d'une gélose purifiée du commerce (par exemple, une gélose purifiée en paillettes ou du Bacto-Agar de la marque Difco), nous la dissolvons à chaud, la filtrons, la laissons se prendre en gel, qui, découpé en petits cubes, est soumis à un lavage prolongé (au moins 48 heures) dans de l'eau distillée qu'on change souvent. On peut éventuellement effectuer ce lavage directement sur le produit commercial et éviter la filtration, si ce dernier est purifié convenablement; dans ce cas on peut jeter le fond du gel qui contient souvent diverses particules ou poussières. Cette simple purification est généralement suffisante. Une détermination du poids sec du produit permet de calculer la quantité de la gélose lavée ou du gel purifié à prélever pour le fondre dans un volume convenable de la solution-tampon choisie afin d'obtenir les concentrations finales en gélose et en tampon qu'on se propose d'utiliser. D'une manière générale nous avons eu de bons résultats en utilisant des concentrations finales en gélose de 1,5 à 2%. Des concentrations plus faibles aboutissent à des gels trop mous et il est évident qu'on n'a aucun intérêt à utiliser des concentrations trop élevées. Afin d'éviter la dégradation de la gélose par des chauffages répétés, nous préparons dans des petits ballons des portions de gélose tamponnée juste suffisante pour faire un nombre déterminé de plaques de gélose.

Jusqu'à présent, nous n'avons pas trouvé parmi les autres substances gélifiantes (gélatine, silice, pectine, etc) de produit qui réunit toutes les qualités requises.

(b) *Préparation des plaques.* Pour avoir un gel aussi uniforme que possible, il est préférable d'utiliser des solutions de gélose très chaudes et entièrement fondues. Comme support du gel nous utilisons des plaques de verre photographique (13 x 18 cm), préalablement lavées très soigneusement et recouvertes d'une très mince couche de gélose séchée* (on peut réaliser cette couche avec une solution très diluée de gélose qu'on distribue uniformément et qu'on laisse ensuite sécher à l'étuve). Grâce à cette précaution, le gel s'attache mieux au verre.

Pour obtenir un gel d'épaisseur uniforme (nous utilisons généralement des gels de 3 ou 4 mm d'épaisseur), il faut que les plaques de verre soient bien horizontales. Le moyen le plus simple (voir Fig. 1) de le réaliser est de placer ces plaques sur une couche de gélose refroidie dans des cuvettes plates de dimensions appropriées. Nous plaçons ensuite sur les deux bouts des plaques en verre des bandes de papier-filtre épais qui serviront ensuite de jonction entre le gel et les vases électrodes; pour que cette jonction soit efficace il faut que ces bandes de papier soient incluses dans le gel qui recouvre les plaques de verre; de plus, il faut que le papier qui dépasse le verre soit recouvert d'une

* Comme on le fait lorsque l'on emploi des tubes⁴.

couche uniforme de gélose. Une fois ces bandes de papier en place, nous versons la gélose chaude et laissons le gel se prendre. Lorsqu'il est solide, nous découpons un petit trou à l'emporte-pièce dans la plaque de gélose, nous y introduisons le produit à analyser, soit sous forme de solution liquide, soit, mieux, mélangé à de la gélose fondu à une concentration telle que le mélange final ait la même concentration en gélose que tout le gel.

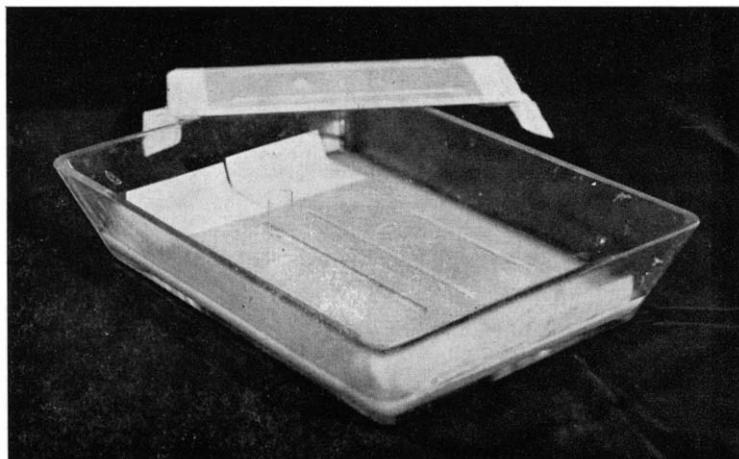


Fig. 1. Préparation des plaques de gélose.

L'électrophorèse

(a) Le dispositif que nous avons adopté est voisin de celui qu'on utilise dans l'électrophorèse sur papier et de celui décrit par GORDON et ses collab.¹⁰ pour l'électrophorèse en gélose. La Fig. 2 représente le dispositif employé: la plaque de verre recouverte du gel est placée sur deux cuvettes en matière plastique qui servent de vases-électrodes. Les morceaux de papier-filtre plongent dans ces cuvettes. Un courant lent de la solution-tampon traverse ces cuvettes et assure la stabilité du pH. Les électrodes sont constituées par du fil de platine tendu sur des plaques en matière plastique.

(b) *Le courant électrique* est fourni généralement par un redresseur-transformateur. Il est évident que l'on a intérêt à raccourcir le temps d'électrophorèse pour éviter une trop grande diffusion libre des constituants du mélange à analyser. On est donc amené à utiliser un voltage élevé. On est cependant limité par l'effet thermique engendré par le passage du courant, qui dépend naturellement de la conductivité de la solution-tampon qui imbibé le gel de gélose. Avec les solutions que nous avons choisies (voir ci-dessous), un potentiel de 3 à 4 volts/cm permet d'obtenir un transport des protéines suffisant en 4 heures. Dans ces conditions on a de 40 à 50 mA par plaque de gélose de 13 × 18 cm suivant l'épaisseur du gel et la solution tampon utilisée (avec un ampérage plus élevé, l'effet thermique devient gênant). Il faut noter qu'une assez forte chute de potentiel est provoquée par les morceaux de papier-filtre, qui servent de jonction entre le gel et les vases à électrodes, s'ils ne sont pas recouverts d'une couche de gélose; il est donc préférable de mesurer le potentiel aux bords du gel pour se rendre compte du voltage utile.

(c) Le choix des *solutions-tampons* est conditionné, par le pH auquel on veut effectuer l'électrophorèse. Leur concentration doit être suffisante pour assurer la constance du pH et pas trop élevée afin d'éviter les effets thermiques avec le courant employé qui engendreraient une évaporation, donc des modifications des concentrations à l'intérieur du gel, et parfois des cassures du gel.

Diverses expériences nous ont montré que des solutions-tampons de force ionique 0.05 permettent d'obtenir de bons résultats. Dans la plupart des recherches effectuées jusqu'à maintenant, nous avons utilisé des solutions de véronal sodique, dont le pH a été ajusté à 8.2 par du HCl*. Une solution-mère de concentration double est utilisée pour préparer des solutions de gélose ayant la même teneur en tampon que la solution qui baigne les électrodes.

(d) *La température* à laquelle est effectuée l'électrophorèse a certainement une influence, mais l'expérience montre que l'on peut obtenir de bons résultats même en opérant à la température du laboratoire, sans précautions spéciales. Des essais de réfrigération des plaques pendant l'électrophorèse n'ont pas amélioré les résultats.

I l'échauffement du gel par le passage du courant électrique provoque une certaine évaporation,

* Véronal sodique 0.1 N 770 ml; HCl 0.1 N 230 ml.

mais il ne semble pas qu'elle soit néfaste. Nous nous proposons d'essayer des dispositifs différents pour réduire cet effet. L'adjonction de glycérine au gel et à la solution-tampon, en diminuant très sensiblement la conductivité du milieu a aussi ralenti la migration électrophorétique des protéines; dans ces conditions on est obligé d'augmenter proportionnellement le temps de l'électrophorèse, ce qui n'est pas avantageux.

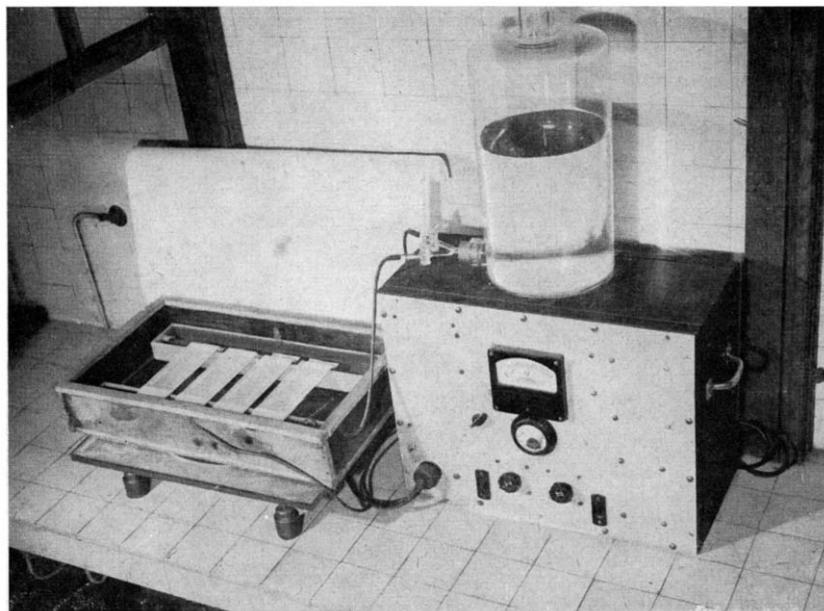


Fig. 2. Dispositif d'électrophorèse.

(e) *Le temps* nécessaire pour disperser les différents constituants d'un mélange dépend évidemment des différences entre les mobilités des composés du mélange dans les conditions où l'on s'est placé: pH, potentiel électrique, température. Lorsque le mélange est complexe on a avantage à prolonger l'électrophorèse un temps suffisant pour obtenir une meilleure dispersion des constituants ayant des vitesses de migration voisines.

En somme, les conditions dans lesquelles on peut obtenir les résultats désirés doivent être précisées dans chaque cas particulier, en tenant compte de ce qui vient d'être dit, c'est-à-dire en tâchant d'avoir une différence de potentiel aussi élevée que possible sans provoquer trop d'échauffement et une concentration en solution tampon suffisante pour éviter des modifications du pH.

La réaction de précipitation

(a) Les *immunsérum*s doivent être fortement précipitants et contenir des anticorps envers tous les constituants antigéniques du mélange. Dans le cas de mélanges peu connus, il est donc utile d'hyperimmuniser les animaux donneurs du sérum et de faire des essais préliminaires sur les sérum individuels, car il est fréquent que les animaux réagissent fort différemment à l'immunisation.

(b) La réaction de précipitation est plus complète au pH *neutre*; il est donc préférable de ramener le pH du gel à la neutralité, si l'électrophorèse a été faite à un pH nettement différent. A cet effet, nous plongeons les plaques recouvertes du gel, après l'électrophorèse dans un bain constitué par une solution-tampon, par exemple, de phosphates de pH 7 à 7,4 et isotonique.

(c) Pour faire réagir l'immunsérum deux procédés différents se sont révélés possibles. Ou bien on verse le sérum dans des cuvettes allongées formées dans le gel. A cet effet lors du coulage de la gélose sur les plaques en verre on dépose deux baguettes de verre parallèlement à l'axe de migration électrophorétique et à une distance convenable et constante (afin d'obtenir des résultats comparables) du trou central qui permet à verser l'échantillon à étudier. Lorsqu'on enlève ces baguettes, leurs empreintes forment des cuvettes régulières.

On peut, d'autre part, faire couler des bandes de gélose contenant l'immunsérum. A cet effet, une fois l'électrophorèse terminée on découpe dans le gel initial des bandes parallèles à l'axe de migration électrophorétique et on coule à leur place l'immunsérum mélangé à de la gélose fondue.

Lorsqu'on utilise l'immunsérum liquide, la diffusion des anticorps est plus rapide et de ce fait

les précipités spécifiques apparaissent plus vite. Par contre, lorsque l'immunsérum est gélifié et qu'on arrive à réaliser une parfaite jonction entre le gel initial et l'immunsérum gélifié, la diffusion des anticorps semble être plus régulière et l'ensemble se conserve très longtemps; on peut ainsi observer facilement l'évolution des précipitations, même lorsqu'elles sont tardives.

Les quantités d'immunsérum à employer doivent être choisis en fonction des quantités du produit analysé de manière à avoir des proportions aussi voisines que possible de la zone d'équivalence de la réaction de précipitation spécifique. Ceci est particulièrement important lorsqu'on utilise un immunsérum de cheval qui ne donne des précipités avec les antigènes protéiques que dans une zone restreinte de rapports antigène/anticorps.

Lorsqu'on étudie des mélanges, il est utile de faire plusieurs essais en utilisant des quantités différentes du produit, car les zones d'équivalence des divers constituants peuvent être assez distantes.

De plus, il peut être utile de faire réagir deux sérums différents des deux côtés du gel, ou même, pour préciser une ligne de précipitation particulière, un troisième immunsérum, en l'introduisant dans un trou supplémentaire que l'on fait dans le gel¹¹.

(d) *Le temps nécessaire pour que la réaction se produise dépend de la concentration des réactifs (antigènes et anticorps) et de la distance à laquelle on les dispose. Généralement, en plaçant l'immunsérum à une distance de 10 mm du bord du trou où l'on introduit l'échantillon à analyser, on peut observer les premières lignes de précipitation spécifique au bout de 24 h lorsqu'on utilise l'immunsérum liquide, tandis qu'avec ce sérum inclus dans la gélose, l'apparition est retardée. Mais il faut prolonger les observations, puisque des lignes correspondant aux composés mineurs (ou aux impuretés) apparaissent parfois très tardivement.*

Pendant tout le temps du développement des précipitations spécifiques il faut conserver les plaques dans des "chambres humides" et à température constante, ou tout au moins à l'abri de variations brusques de température.

Pour éviter des croissances microbiennes nous ajoutons à tous les produits et à la gélose un antiseptique (l'éthyl-mercuri-thiosalicylate de sodium à 1 pour 5 ou 10,000) et nous étalons, de temps en temps, cet antiseptique à la surface du gel. De plus, la "chambre humide" est badigeonnée avec du toluène et avec une solution étendue de CuSO_4 pour éviter les moisissures.

Enregistrement des résultats

La technique la plus simple consiste à faire des photographies par superposition directe de la plaque avec le gel à du papier photographique dur ou à des films à fort contraste. Pour éviter la reproduction photographique des irrégularités de la surface du gel on effectue les photographies en immergeant le papier photographique et le gel dans de l'eau (solution physiologique).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La spécificité étroite des réactions immunochimiques, et particulièrement celles où l'antigène est une protéine, permet de prévoir que dans un mélange d'antigènes chaque constituant réagira indépendamment avec l'anticorps correspondant. On doit cependant envisager également l'éventualité de réactions croisées. Sous l'effet du champ électrique les différents constituants du mélange initial vont se déplacer dans le gel et à la fin de l'électrophorèse ils se trouvent à des endroits différents suivant leurs mobilités; l'espace qu'ils occupent dans le gel doit avoir un volume légèrement supérieur à celui du trou initial dans lequel on dépose le produit à analyser, car pendant le temps d'électrophorèse ils ont aussi la possibilité de diffuser librement. Ils continuent ensuite de diffuser dans le gel dans toutes les directions (Fig. 3). Les anticorps, de leur côté, diffusent perpendiculairement à l'axe de migration électrophorétique. La précipitation spécifique ayant lieu lorsque les antigènes et les anticorps se trouvent en proportion convenable, il est évident que les précipités qui prennent naissance formeront des arcs d'un ellipsoïde régulier. Inversement, si ce précipité ne forme pas un arc régulier on peut en conclure que la substance en cause ne possède pas une dispersion uniforme des mobilités électrophorétiques.

Le nombre de bandes de précipitation indépendantes permet de savoir le nombre minimum d'antigènes différents présents dans le mélange, si l'immunsérum utilisé renferme des anticorps envers tous ces antigènes (voir plus bas), tandis que la position

de ces bandes permet de définir ces antigènes par leurs mobilités électrophorétiques relatives. Lorsqu'on possède un des constituants du mélange à l'état purifié on peut facilement identifier la bande de précipitation qui lui correspond soit en absorbant les anticorps correspondants dans l'immunsérum employé, ce qui fait disparaître la bande en question, soit en enrichissant le mélange étudié par ce composé, ce qui modifie la bande de précipité spécifique correspondante par rapport à un essai témoin.

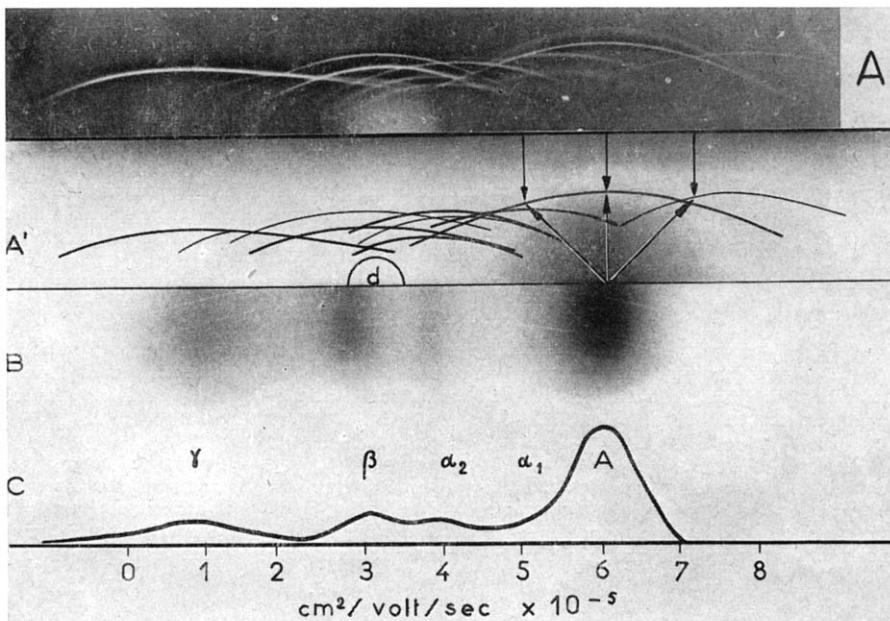


Fig. 3. Comparaison entre diverses méthodes d'électrophorèse. A. photo d'une expérience d'analyse immuno-électrophorétique d'un sérum humain normal. A' schéma expliquant la formation des lignes de précipitation spécifique; B. Electrophorèse sur papier, et C. Electrophorèse en milieu liquide du même sérum humain dans le même tampon.

Dans son état actuel, la méthode n'est pas quantitative, mais en faisant des essais avec des quantités différentes du mélange à analyser, on arrive à fixer les limites des dilutions où certaines lignes de précipitation disparaissent. Pour quelques protéines purifiées du sérum et avec un immunsérum de cheval nous avons trouvé une limite de sensibilité de l'ordre de 3 à 10 μg ¹².

Le principal inconvénient de la méthode, comme d'ailleurs de toutes les méthodes immunologiques, c'est la difficulté de préparer des immunsérum identiques. Chaque animal réagit différemment et le cas n'est pas rare qu'un animal ne forme pas d'anticorps envers un ou plusieurs constituants du mélange. Il est donc préférable d'essayer plusieurs sérum différents lorsqu'on veut dénombrer les constituants d'un mélange et même dans ce cas on ne peut pas affirmer avec certitude qu'il n'existe pas dans le mélange étudié des constituants (en faible proportion ou mauvais antigènes) pour lesquels les animaux n'ont pas formé d'anticorps ou seulement des anticorps non-précipitants. Nous avons aussi constaté qu'au cours d'une conservation très prolongée (plus de deux ans) la concentration des anticorps envers certains constituants d'un mélange semble diminuer plus rapidement que d'autres.

Un autre inconvénient de la méthode est l'importance de l'électroendosmose. Dans l'état actuel de la méthode nous observons un déplacement par électroendosmose des constituants immobiles presque aussi important que le transport électrophorétique de la sérumalbumine (pH = 8.2; tampon au véronal de force ionique 0.05). Jusqu'à présent nous ne sommes pas arrivés à trouver un moyen simple pour diminuer cet effet. On peut cependant ajouter que le but principal, la dispersion régulière dans des conditions choisies des constituants d'un mélange par électrophorèse, ne devrait pas être en cause si on admet (ce qui n'a pas encore été prouvé) que toutes les substances sont entraînées d'une manière identique par le déplacement du liquide par électroendosmose. Pour le moment, nous nous limitons à tenir compte de l'existence de l'électroendosmose et pour cela nous plaçons l'échantillon à examiner dans le gel de telle façon que malgré l'électroendosmose tous les constituants du mélange soient présents dans le gel à la fin de l'électrophorèse, et à des distances suffisantes les uns des autres.

Il est évident que la régularité des résultats dépend aussi de l'uniformité du gel et de la non-intervention de la gélose. Nous savons que tout au moins dans certains cas¹³ des constituants de la gélose peuvent réagir avec des sérum. Mais, d'une part, nous n'avons pas trouvé de substances pouvant remplacer avantageusement la gélose et, d'autre part, nous la nettoyons soigneusement et évitons de la chauffer à plusieurs reprises. Or, il semble que les substances qui réagissent avec le sérum apparaissent surtout lorsqu'on soumet la gélose à un chauffage à l'autoclave¹³. En fait, nous avons observé dans le cas des γ -globulines un ralentissement qui pourrait être interprété par une réaction avec la gélose bien que les différences de mobilités électrophorétiques soient dues en majeure partie aux propriétés électrochimiques des γ -globulines¹².

Malgré ces quelques inconvénients, nous croyons que la méthode présente des avantages aussi bien par rapport à l'électrophorèse classique que par rapport aux réactions immunologiques en milieu gélifié.

En effet, grâce aux réactions immunologiques spécifiques on peut distinguer des constituants d'un mélange même si leurs mobilités sont identiques ou très voisines, ce qui n'est pas possible avec les méthodes électrophorétiques connues, particulièrement lorsqu'il s'agit de constituants présents à une faible concentration. D'autre part, grâce à la dispersion des composants d'un mélange par le champ électrique, les bandes de précipitation sont séparées et il y a donc très peu de chances pour qu'il y ait superposition de deux bandes, comme cela peut arriver lorsqu'on emploie les techniques de précipitation en milieu gélifié¹⁴. De ce fait, il est plus aisément de distinguer entre un éventuel dédoublement d'une bande de précipitation¹⁵ et la présence de deux bandes distinctes: dans le premier cas, le dédoublement débute à la partie centrale de l'arc de précipitation, c'est-à-dire à l'endroit où l'éventuel excès d'antigène peut intervenir plus rapidement. Par contre, lorsqu'il y a deux précipités indépendants, leurs maxima n'auront généralement pas des positions identiques, par suite de différences dans les migrations électrophorétiques. Même si ces dernières sont identiques, les bandes de précipitation seront parallèles mais indépendantes, si les constantes de diffusion des substances étudiées ou les rapports entre les quantités respectives d'anticorps et d'antigènes sont différents.

Il est évident que dans l'état actuel cette méthode reste partiellement empirique car certaines conditions n'ont pas encore été systématiquement étudiées. Ainsi, le rôle de la concentration, et de la constitution chimique de la gélose, de même que les variations expérimentales du pH et la présence de sels différents peuvent avoir une grande importance et leur étude permettra certainement l'obtention de renseignements plus précis.

surtout en ce qui concerne les positions relatives des divers constituants des mélanges. Telle qu'elle est, cependant, elle a été utilisée avec fruit dans diverses études^{3, 11, 12, 16, 17, 18}.

RÉSUMÉ

On effectue d'abord une électrophorèse du produit à étudier dans un gel de gélose à 1,5-2 % dans un tampon véronal de $I/2 = 0,05$ et avec une chute de potentiel de 3-4 V/cm dans le gel. On fait ensuite diffuser des immunoséruma précipitants perpendiculairement à l'axe de migration électrophorétique. Chaque constituant du mélange étudié donne une bande de précipitation spécifique indépendante, ce qui permet de le distinguer grâce à sa spécificité immunologique et de le définir par sa mobilité électrophorétique relative.

Les détails techniques sont décrits et les possibilités de la méthode sont discutées.

SUMMARY

Firstly, electrophoresis of the substance to be studied is carried out in a 1.5-2 % agar gel in a veronal buffer solution of $I/2 = 0,05$ and with a drop in potential of 3-4 V/cm in the gel. Then the precipitating immune serum is diffused perpendicularly to the electrophoretic migration axis. Each constituent of the mixture studied gives an independent specific precipitation band, which can be distinguished owing to its immunological specificity and defined by its relative electrophoretic mobility.

The technical details are described and the possibilities of the method discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Man erzeugt zuerst eine Elektrophorese des zu studierenden Produktes in einem Gel von 1,5-2 % Gelose in einem Veronalpuffer von $I/2 = 0,05$ mit einem Potentialabfall von 3-4 V/cm im Gel. Dann lässt man precipitierende Immunsera senkrecht zur elektrophoretischen Wanderungsachse diffundieren. Jede Komponente der studierten Mischung zeigt eine unabhängige spezifische Präcipitationsbande, welche gestattet, sie zu unterscheiden dank ihrer immunologischen Spezifität und sie durch ihre relative elektrophoretische Beweglichkeit zu charakterisieren.

Die technischen Einzelheiten sind beschrieben und die Möglichkeiten der Methode diskutiert.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. GRABAR ET C. A. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- 2 P. GRABAR, *Les globulines du sérum sanguin*; Désor, Liège, 1947.
- 3 P. GRABAR, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 65.
- 4 J. OUDIN, *Compt. rend.*, 222 (1946) 115; *Méthodes in Med. Res.*, 5 (1952) 335.
- 5 O. OUCHTERLONY, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 25 (1948) 186, et 32 (1953) 231.
- 6 C. L. OAKLEY ET A. J. FULTHORPE, *J. Pathol. Bacteriol.*, 65 (1953) 49.
- 7 E. L. BECKER ET J. MUÑOZ, *J. Immunol.*, 63 (1949) 173.
- 8 P. GRABAR ET C. LAPRESLE, *Compt. rend.*, 21me Congrès Biochim. Paris, 1952, p. 390.
- 9 J. OUDIN, *Ann. Inst. Pasteur*, 85 (1953) 336.
- 10 A. H. GORDON, B. KEIL, K. SEBESTA, O. KNESSL ET F. SORM, *Coll. Tr. Chim. Tchécosl.*, 15 (1950) 1.
- 11 M. KAMINSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 216.
- 12 C. A. WILLIAMS ET P. GRABAR (en impression).
- 13 A. M. STAUB ET P. GRABAR, *Ann. Inst. Pasteur*, 69 (1943) 268.
- 14 M. KAMINSKI, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 279 et 289.
- 15 P. BURTIN, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 1021.
- 16 C. A. WILLIAMS, *Compt. rend. XIV, congr. int. zool.*, Copenhague 1953 (à paraître); *Compt. rend. VI congr. int. microb. Rome 1953* (à paraître).
- 17 P. BURTIN, P. GRABAR, G. BOUSSIER ET M. F. JAYLE, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 1029.
- 18 M. KAMINSKI ET J. DURIEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 1037.

Reçu le 22 septembre 1954