

Die Immunoelktrophorese in Agar-Gel

Methode und Ergebnisse

Von CH. WUNDERLY*

Einleitung. Die Geschichte der Naturwissenschaft zeigt uns, wie die Gedanken zu neuen Messmöglichkeiten sich manchmal zu einer oder zwei Arbeiten verdichten und darauf wieder für Jahrzehnte in Vergessenheit geraten. So blieb der Nachweis von Autoantikörpern, wie ihn WIDAL¹ und CHAUFFARD² bereits 1908 beschrieben hatten, für 30 Jahre unbenutzt. Obwohl in diesen frühen Arbeiten genau unterschieden wurde zwischen Autohämolyse und Autoagglutination einerseits sowie Isohämolyse und Isoagglutination andererseits, betrachteten Autoren³ 1937/1938 den Nachweis von Autoagglutination als erstmalig. Ähnlich blieben die Arbeiten von KÖNIG⁴, der schon 1939 Papier als Trägermedium für die elektrophoretische Trennung von Farbgemischen benutzt hatte, unbeachtet. Erst als die analytische Chemie begann, auch makromolekulare Stoffgemische vermehrt in den Kreis der Betrachtung zu ziehen, erkannten etwa gleichzeitig DURRUM⁵, CREMER und TISELIUS⁶, TURBA und ENENKEL⁷ sowie GRASSMAN und HANNIG⁸ die bedeutenden Möglichkeiten dieser Methode. Wesentlich früher, nämlich 1907, hatten bereits FIELD und TEAGUE⁹ in einem U-Rohr, das mit Agar-Gel gefüllt war, Diphtherietoxin und Antitoxin elektrophoretisch getrennt. Darauf blieb die Methode unbenutzt, bis ihr GORDON¹⁰ 1949 eine neue Form der Ausführung gab. Bereits 1905 war von mehreren Autoren¹¹ gezeigt worden, wie die Beobachtung des interzonalen Präzipitintestes oder des «Ringtestes» erleichtert wird durch die Stabilisierung in

Gelen. So benützten NICOLLE, CESARI und DEBAINS¹² 1920 Gelatine-Gel, um der raschen Auflösung von spezifischem Präzipitat in Antigen-Überschuss entgegenzuwirken. OUDIN¹³ zeigte 1946, wie im Reagenzglas, gefüllt mit glasklarem Agar-Gel, als Folge der *einfachen Diffusion* die Präzipitattbildung zwischen Antigen und Antikörper nach Massgabe von Konzentration und Diffusionskoeffizient gut zu beobachten ist. Die etwa gleichzeitig entwickelte Plattenmethode mit *doppelter Diffusion* von OUCHTERLONY¹⁴ sowie die Arbeiten von ELEK¹⁵ gaben dieser Methode eine Ausführungsform¹⁶, welche heute als Agardiffusionstest eine zunehmende Verwendung findet¹⁷, da sie nicht nur die Zahl der Antigene bestimmen lässt, sondern auch den Vergleich verschiedener Antigenlösungen zulässt.

Der Agardiffusionstest. Durch die Bildung von Präzipitatlinien gibt die Diffusionsplatte zu erkennen, wie viel serologisch aktive Substanzen in Antigenen oder auch in Extrakten von Mikroorganismen gegen ein bekanntes Antiserum vorhanden sind. Dazu werden in das Agar-Gel 3-5 Vertiefungen ausgestanzt und die Sera hineinpipettiert. Zumeist befindet sich das Antiserum in zentraler Stellung. Sind in mehreren Sera dieselben löslichen Antigene enthalten, so fließen die Präzipitatlinien ineinander über, während die Linien völlig verschiedener Antigene einander kreuzen. Dieses Unterscheidungsmerkmal ist der hauptsächlichste Fortschritt der Ouchterlony-Technik¹⁸. Das Gel übt auf die

* Medizinische Universitätsklinik, Zürich.

¹ F. WIDAL, P. ABRAMI und M. BRULÉ, Arch. Mal. Cœur 1, 193 (1908).

² A. CHAUFFARD und J. TROISIÉRE, Sem. médicale 28, 345 (1908).

³ A. GIORDANO und L. BLUM, Amer. J. med. Sci. 194, 311 (1937). - I. DAVIDSON, Amer. clin. Path. 24, 1333 (1954). - H. GREENWALD, Amer. J. med. Sci. 196, 179 (1938).

⁴ P. KÖNIG, Actas III. Congr. Sud-Americ. chimica 2, 334 (1937).

⁵ D. V. KLOBUSITZKY und P. KÖNIG, Arch. exper. Path. Pharmak. 192, 271 (1939).

⁶ E. DURRUM, J. Amer. chem. Soc. 72, 2943 (1950).

⁷ D. CREMER und A. TISELIUS, Biochem. Z. 320, 273 (1950).

⁸ F. TURBA und H. ENENKEL, Naturwiss. 37, 93 (1950).

⁹ W. GRASSMAN und K. HANNIG, Naturwiss. 37, 496 (1950).

¹⁰ C. W. FIELD und O. TEAGUE, J. exper. Med. 9, 86, 225 (1907).

¹¹ A. GORDON, B. KEIL und K. SEBESTA, Nature 146, 499 (1949). - A. GORDON, B. KEIL, K. SEBESTA, P. KNESSL und F. SORM, Coll. Trav. chim. Tchecosl. 15, 1 (1950).

¹² H. BECHHOLD, Z. phys. Chem. 52, 185 (1905).

¹³ M. NICOLLE, E. CESARI und S. DEBAINS, Ann. Inst. Pasteur 34, 149 (1920).

¹⁴ J. OUDIN, C. R. Acad. Sci. Paris 222, 115 (1946); 228, 1890 (1949); Methods med. Res. 5, 335 (1952).

¹⁵ O. OUCHTERLONY, Acta path. microbiol. scand. 26, 507, 516 (1949); Ark. Kemi 26 B, 1, 43, 55 (1949).

¹⁶ S. ELEK, Brit. J. exper. Pathol. 30, 484 (1949).

¹⁷ O. OUCHTERLONY, H. ERICSSON und C. NEUMÖLLER, Acta med. scand. 138, 76 (1950).

¹⁸ C. SCHIOTT, Acta path. microbiol. scand. 32, 251 (1953). - H. E. SCHULTZE, Z. Elektrochem. 60, 262 (1956). - P. BURTON, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 335 (1954). - H. SEELIGER, Z. Hygiene 141, 110 (1955). - H. SEELIGER und G. LINZENMEIER, Z. Hygiene 136, 355 (1953). - P. GELL, J. clin. Pathol. 8, 269 (1955). - P. GRABAR, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 65 (1954). - P. GRABAR, M. SELIGMANN und J. BERNARD, Ann. Inst. Pasteur 88, 548 (1955). - L. KORNGOLD und R. LIPARI, Cancer 9, 183, 262 (1956). - R. AUGUSTIN, Quart. Rev. Allergy 9, 504 (1955).

¹⁹ O. OUCHTERLONY et al., Acta med. scand. 138, 76 (1950). - Vgl. P. GELL, J. clin. Pathol. 8, 269 (1955).

Diffusion der Proteinmoleküle eine verzögernde Wirkung aus, so dass die Werte der Svedbergschen Diffusionsgleichung nicht ganz erreicht werden¹⁸. Als Standardvergleich verwendet man mit Vorteil solche Proteine, deren *antigene Natur homogen* ist. Unter den menschlichen Serumproteinen sind es das *Albumin*, einzelne Bestandteile des *γ-Globulin*, die *Haptoglobinkomponenten*, sowie das *Siderophilin*, welche in einer immunologisch hinreichenden Reinheit isoliert sind. Diese hochgereinigten Serumanteile ermöglichen beispielsweise in der «Ouchterlony-Petrischale» den Vergleich ihrer antigenen Eigenschaften mit dem Serumalbumin bei *Lipoidnephrose*¹⁹ oder *Hepatopathien*²⁰. Ebenso hat sich der Agar-Diffusionstest beim Studium der Toxin-Antitoxinreaktionen bewährt, sowie bei der Reinheitsprüfung von isolierten Toxinpräparaten und Toxoiden, bei der Wertigkeitsbestimmung antitoxischer Seren und der Rezeptorenanalyse. Der Diffusionsplattentest wurde soweit verfeinert, dass bei der Prüfung antitoxischer Sera Rezeptoren gegen Nährbodenbestandteile nachweisbar wurden²¹, die selbst antigene Wirksamkeit besaßen. Lösliche Antigene²², welche ein Gemisch mehrerer Teilkomponenten darstellen, besitzen im Agar-Gel eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit und geben dadurch mit homologen Antikörperfraktionen getrennte Präzipitatlinien²³. Um zu einer sicheren Trennung zu gelangen, ist es freilich notwendig, die Antigenkonzentration in ein optimales Verhältnis zur Menge der Serumantikörper zu bringen. Die Deutung einer Mehrzahl von Typen- und Gruppenantigenen hat eine grosse Zahl vergleichender Untersuchungen an bekannten Stämmen und absorbierten Seren zur Voraussetzung; auch ist der Einfluss unspezifischer Verunreinigungen des Antigens auf den Ablauf der serologischen Reaktion oft schwer abzuschätzen. Ein Hauptvorteil liegt in der grossen Kombinationsmöglichkeit und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse; ferner ist der Arbeitsaufwand kleiner als bei der quantitativ geleiteten Ausführung der Präzipitin-Reaktion²⁴. An Empfindlichkeit und Spezifität der Aussage übertrifft sie jede rein physikalisch-chemische Methode. Nehmen wir als Beispiel die *freie Elektrophorese*, in welcher Proteinsole von 1% untersucht werden, dann braucht es mindestens 5% des Gesamtproteins (etwa 14 mg), um einen eigenen Gradienten zu bilden, der messbar ist²⁵. Die Mikroausführungen der freien Elektrophorese (KERN, ANTWEILER) haben die notwendige Serummenge seither auf

0,1 ml herabgemindert. Die *Empfindlichkeit* ist somit von ganz anderer Grössenordnung, denn für die *Präzipitation im Agar-Gel* werden etwa 0,002–0,001 mg *Antigen* benötigt und für seine quantitative Bestimmung²⁶ nach der Methode von FOLIN gar nur etwa 0,008 mg. Es war die Hyperimmunisation des Pferdes notwendig, um mit freier Elektrophorese im Diphtherie- oder Tetanusserum eine neue Proteinkomponente *T* entstehen zu lassen²⁷. Sie zeigt eine elektrophoretische Beweglichkeit zwischen der von normalem β- und γ-Globulin²⁸. Beim erwachsenen Menschen wandern die im Verlaufe manifester oder okkulten Infektionen gebildeten Antikörper nahezu ausschliesslich mit der Beweglichkeit von normalem γ-Globulin²⁹. Es gelang weder mit chemischen Methoden (Aminosäure-Analyse) noch mit physikalisch-chemischen (Ultrazentrifugation, Diffusion, Ultravioletabsorption) einen Unterschied messbar zu machen zwischen normalem γ-Globulin und Antikörperglobulin. Bisherige Ergebnisse mit Endgruppenanalyse sind noch uneinheitlich in ihren Schlussfolgerungen. Auch die Auftrennung spezifischer Präzipitate in freier Elektrophorese³⁰ führte nicht wesentlich weiter, denn dessen Zusammensetzung ist abhängig von der Konzentration der reagierenden Komponenten und folgt keiner stöchiometrischen Gesetzmässigkeit.

I. *Voraussetzung für die Immunoelktrophorese (Prinzip der Methode)*. Wenn so die Elektrophoresetechnik der Serologie vorerst keinen wesentlichen Fortschritt brachte, so änderten sich die Messmöglichkeiten nachhaltig, als GRABAR und WILLIAMS³¹ 1953 die Kombination von Elektrophorese und serologischer Präzipitation in Agar-Gel verwirklichten. Nachfolgend sei kurz das *Prinzip der Methode* dargelegt. Das zu trennende Proteingemisch (Serum, Liquor cerebros. Lymphe, Ascites u.a.) wird im Agar-Gel der Elektrophorese unterworfen. Nach hinlänglicher Auftrennung der Fraktionen wird in eine Vertiefung des Agar-Gel, welche längs der Wanderungsrichtung der Proteine verläuft, entsprechendes Antiserum einfliessen gelassen. Dasselbe diffundiert allmählich seitlich zu den Proteinfraktionen. An jenen Stellen, wo Antigene und ihre spezifischen Antikörper zusammentreffen, bilden sich leicht gekrümmte Präzipitatlinien. *Das Ergebnis zeitigt serologisch eine verfeinerte Antigenanalyse und physikalisch-chemisch die Charakterisierung der einzelnen Komponenten auf Grund ihrer Wanderungsge-*

¹⁹ P. BURTIN und P. GRABAR, Sem. Hôp. Paris 30, 1 (1954).

²⁰ P. BURTIN, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 1021 (1954).

²¹ R. JENNINGS, J. Immunol. 70, 181 (1953); J. Bact. 67, 559, 565 (1953).

²² C. POPE, M. STEVENS, E. CASPARY und E. FENTON, Brit. J. exper. Pathol. 32, 246 (1951).

²³ O. OUCHTERLONY, Acta path. microbiol. scand. 32, 231 (1953).

²⁴ M. HEIDELBERGER, Serological approaches to studies of Protein structure and metabolism (Rudgers Univ. Press, 1954).

²⁵ E. KABAT und M. MAYER, Experimental-Immunochemistry (Springfield, USA, 1948).

²⁶ P. GRABAR, VI. Kongr. Int. Microbiol. Rom 1953, 169.

²⁷ V. D. SCHEER, R. WICKOFF und F. H. CLARKE, J. Immunol. 39, 65 (1940).

²⁸ E. L. SMITH, J. biol. Chem. 164, 345 (1946). – E. L. SMITH und D. BROWN, J. biol. Chem. 183, 241 (1950).

²⁹ B. JAGER, E. SMITH, M. NICKERSON und D. BROWN, J. biol. Chem. 176, 1177 (1948).

³⁰ E. KABAT und J. MURRAY, J. biol. Chem. 182, 251 (1950). – M. COHN, H. DEUTSCH und L. WETTER, J. Immunol. 64, 381 (1950). – B. JAGER und C. GUBLER, J. Immunol. 69, 311 (1952).

³¹ P. GRABAR und C. WILLIAMS, Biochim. biophys. Acta 10, 193 (1953); 17, 67 (1955).

schwindigkeit. Die Voraussetzung war ein Angleichen der Proteinkonzentration bei Elektrophorese und serologischer Reaktion. Wie oben gezeigt wurde, ist dieselbe in der Tiselius-Ausführung der Elektrophorese wesentlich höher, als es die Präzipitation erfordert. Diese letztere erlaubt aber nur eine geringe Variationsbreite in der Konzentration der beiden Komponenten, ansonst Fällungen entstehen können, die sich im Überschuss der Reagenzien lösen. Die Angleichung der Gehalte musste infolgedessen in erster Linie von der elektrophoretischen Seite aus erfolgen. Hier war es von entscheidendem Vorteil, dass für die Auftrennung der Serumproteine im Agar nicht mehr als 700–800 μg benötigt werden. Damit verbleibt für eine einzelne Globulinfraktion 70–100 μg ; diese befinden sich in der 2 mm dicken Agarschicht über eine Fläche von 180 bis 630 mm^2 ausgebreitet, so dass in den Randzonen der zugehörigen Bezirke optimale Verdünnungen der Proteine vorliegen. Auf Grund ihrer rascheren Diffusion verbreitet sich die Albuminfraktion im Agar-Gel über eine grössere Fläche; dadurch wird ihre höhere Ausgangskonzentration etwas ausgeglichen. Entsprechen die gegenseitigen Verhältnisse denjenigen der «equivalence zone», so können auf diesem Wege noch 3 μg Albumin und 4–5 μg Globulin sichtbar gemacht werden. Darin kommt die ausserordentliche *Steigerung der Empfindlichkeit* zum Ausdruck, wie sie durch die Kombination mit *der serologischen Reaktion* möglich wird. Ist die elektrophoretische Auftrennung beendet, so lässt man in längsseitige Aussparungen des Agar-Gels das Antiserum einfließen. Bei einem hochtitrigen Pferdeserum braucht es davon 0,05 ml, da es mit ebensoviel physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden kann. Die zeitliche Beanspruchung folgt dem verschieden raschen Reaktionsablauf, indem für die Elektrophorese 4–5 h genügen, während die anschließende Diffusion des Antiserums bei 18°C 2–3 Tage erfordert (Mikromethode³², s. vorn).

Theoretische Grundlagen. Es gehört zu den Erfordernissen der Immunoelktrophorese, dass die aufgetrennten Proteinfrenten stabilisiert sind. Wenn sich Agar-Gel als Trägermilieu bisher am besten bewährte, so liegt es an der losen, überaus weitmaschigen Textur dieses Gels. Es konnte gezeigt werden, dass der «freie Raum» eines 1%-Agar-Gel nahezu die Gegebenheiten der freien Lösung erreicht³³. Bei hochgereinigtem Agar ist ein 1%-Sol für die Gelbildung ausreichend. Im Stärkeblock (Kartoffelstärke) erreicht der «freie Raum» etwa 40% der Säulenlänge³⁴. Noch ungünstiger liegen die Verhältnisse im Papier, wo der vom Proteinteilchen zurückgelegte Weg eine vielfach ge-

wundene Strecke bedeutet. Die Adsorption der Proteinteilchen an der Zellulose wird dadurch begünstigt und verursacht die nachziehenden «Schleppen»³⁵. Im Agar-Gel dagegen gelangt ein Protein nach Umkehren der Stromrichtung quantitativ wieder an seinen Ausgangspunkt zurück. An den meisten Medien mit dichter Textur spielen die Sorptionsverhältnisse eine wesentliche Rolle für die elektrophoretische Auftrennung. Für die Differenzierung der verschiedenen Arten von Hämoglobin ist deren Adhäsion an der Zellulose eine Voraussetzung³⁶.

So haften im Papier vom vorauswandernden Albumin stets Spuren längs seiner Bahn³⁷; da es sich nur um Mengen handelt, welche unter der methodischen Fehlerbreite liegen, beeinträchtigen sie die quantitative Auswertung kaum; dagegen würde es für die Immunoelktrophorese, mit ihrer gesteigerten Empfindlichkeit, eine unklare Ausgangslage schaffen. Wenn somit bei der Elektrophorese in Agar-Gel β - und γ -Globulin wegen der starken elektroosmotischen Strömung kationisch wandern, so gewährleistet dieser sekundäre Effekt eine besonders saubere Auftrennung. *Hier überlagert sich, der elektrophoretischen Trennwirkung etwa ebenbürtig in der Wirkung, der elektroosmotische Effekt* (siehe folgenden Abschnitt).

Für das Ergebnis ist es von besonderer Wichtigkeit, dass bei der serologischen Reaktion von Antigen und Antigenkörper im Agar-Gel beide Komponenten möglichst im optimalen Gehalt vorhanden sind. Denn das spezifische Präzipitat ist immer löslich in einem Überschuss von Antigen und oft ebenfalls in einem Überschuss von Antikörper (Immunserum vom Pferd). Im idealen Konzentrationsverhältnis ist kein Überschuss vorhanden, weshalb dieser Bereich als «equivalence zone» bezeichnet wird. Die Zone ist um so enger umschrieben, je grösser die Reinheit des betreffenden Antigens ist. Sie ist ferner mit Immunsera vom Pferd besonders scharf definiert, während Kaninchen-Antisera im Agar-Gel einseitig scharf begrenzt sind, jedoch rückwärtig Trübungen erkennen lassen, welche Anlass zu Verschleierungen bieten können. Besteht das Antigen aus einem Polysaccharid, so sind die Präzipitatlinien zumeist unscharf. Die einfachen Diffusionsverhältnisse von Proteinen im Agar-Gel wurden von OUDIN¹³ und BECKER *et al.*³⁸, die doppelte Diffusion dagegen von SALVINIEN³⁹ auch in ihren quantitativen Belangen eingehend untersucht. Es ergab sich, dass das Vorrücken x der Proteinfrent den Diffusionsgesetzen gehorcht und zur Zeit t die einfache Abhängigkeit besteht:

³² J. SCHEIDEGGER, *Int. Arch. Allergy* 7, 103 (1955); *Sem. Hôp. Paris* 1956, 2119.

³³ J. LLOYD und A. SHORE, *Chemistry of the Proteins* (London 1938). – E. BECKER, J. MUNOZ, C. LAPRESLE und L. LE BEAU, *J. Immunol.* 67, 501 (1951).

³⁴ A. BUSSARD und D. PERRIN, *J. Lab. clin. Med.* 46, 689 (1955). – A. BUSSARD, *C. R. Acad. Sci. Paris* 239, 1702 (1954).

³⁵ E. KLEIN, H. HÜNER und F. FRANKEN, *Dtsch. med. Wschr.* 81, 1793 (1956).

³⁶ H. LEHMANN und E. B. SMITH, *Amer. J. clin. Path.* 26, 1270 (1956). – A. SAHA, R. DUTTA und J. GHOSH, *Science* 125, 447 (1957).

³⁷ D. KRAFT und H. BIEL, *Ärztl. Labor* 2, 397 (1956).

³⁸ E. L. BECKER, J. MUNOZ, C. LAPRESLE und L. LE BEAU, *J. Immunol.* 67, 501 (1951).

³⁹ J. SALVINIEN, *J. Chim. phys.* 52, 741 (1955).

$$\frac{x}{\sqrt{t}} = k.$$

Die Konzentration C_{Ar} des Antikörpers im Agar-Gel ist gering gegenüber der Konzentration C_{An} des Antigens in der Lösung, wodurch diese eindringt in die Zone des Antikörpers. Die Geschwindigkeit, mit welcher dies geschieht, ist proportional dem Logarithmus der Antigenkonzentration. Sind mehrere Antigene gleichzeitig vorhanden, so entspricht jedem eine Konstante k . Kennt man C_{Ar} und C_{An} und wird k experimentell bestimmt, dann kann die Diffusionskonstante D für das betreffende Antigen berechnet werden.

Ist die Antigenkonzentration ungenügend, um den Äquivalenzpunkt zu erreichen, dann bilden sich keine Präzipitatlinien. Ebenso kennt man Fälle, wo mit dem Verdünnen des Immunsersums neue Linien auftauchten. Manchmal ergibt sich bei Antigenüberschuss, seltener bei Antikörperüberschuss, eine unspezifische Verdoppelung der Linien; solche Linien überschneiden sich an den Enden des Kreissegmentes, während parallele Linien ohne Schnittpunkte zwei unabhängige Antigene anzeigen. In Fällen von Antigenmischungen ist deshalb die experimentelle Variation der Gehalte angezeigt⁴⁰. OUDIN hat den Satz geprägt: *Die Anzahl antigener Komponenten ist mindestens gleich gross wie die Zahl sichtbarer Präzipitatlinien*. Diese Beobachtungen gelten allgemein für die Diffusion serologisch aktiver Proteine in Agar-Gel.

Die Elektrosmose. Die Erscheinung der Elektrosmose wird von DARMOIS⁴¹ als eine Folge der verschiedenen Hydratation der Ionen erklärt, indem die positiv geladenen Ionen im allgemeinen stärker hydratisiert sind als die negativ geladenen. Infolge ihres kleineren Wassermantels sind die letzteren eher befähigt, die positiv geladenen Seitenketten eines Makromoleküls zu entladen; auch wird dadurch die Flüssigkeitsbewegung in der Richtung der Kathode verständlich. Ferner kann die schwache negative Ladung, welche das Agar-Gel-Gerüst gegenüber der Pufferflüssigkeit annimmt, nur von untergeordneter Bedeutung sein. Der Umfang der Elektrosmose kann auf Grund der Bewegung ungeladener und nichtadsorbierter Testsubstanzen verfolgt werden; als solche wurden H_2O_2 , Formaldehyd, Thioacetamid, Allylthioharnstoff, Hydrochinon, *o*-Nitranilin, Dextran, Xylose und Glukose vorgeschlagen. Die Erfahrung zeigte uns, dass Dextran intravenously clinical, mit einem Molekulargewicht von 80000 ± 10000 , sich gut dafür eignet, um aus der zurückgelegten Distanz eine Bewertung der Wanderungsgeschwindigkeit zu ermöglichen.

Für die Ortsbestimmung projiziert man die vergrößerten Präzipitatlinien auf ein Millimeterpapier und

ermittelt den Schnittpunkt der Tangente. Vergleicht man damit die Werte, wie sie CHRESTFIELD und ALLEN⁴² bei Papier-Elektrophorese mit Koffein bestimmt haben, so zeigt sich die ungleich dichtere Textur der Zellulose, welche der Elektrosmose einen beträchtlichen Widerstand bietet. Es folgt, dass die beiden elektrokinetischen Erscheinungen, *Elektrophorese* und *Elektrosmose*, in hohem Masse abhängig sind von den *Eigenschaften des Trägermediums* (Kalziumgehalt des Agar-Gel usw.).

Ähnlich wie im *Pektin-Gel* ist auch im *Agar-Gel* die feste und flüssige Phase kontinuierlich, das heisst das feste Gerüst dieser Gele gleicht eher einem Schwamm als Honigwaben. Wie ungehindert die elektrophoretische Beweglichkeit von verschiedenen ungeladenen Molekülen in einem 1,25%-Agar-Gel ist, zeigt der folgende Vergleich⁴³. Das Polysaccharid Levan mit dem Molekulargewicht 10000 wandert ebenso rasch wie Glukose und nahezu wie γ -Globulin, Molekulargewicht 170000. So erstaunt es nicht, dass auch die relativen Beweglichkeiten der Proteinfractionen des menschlichen Serums dieselben Werte erreichen, wie sie in der freien Elektrophorese gemessen wurden⁴³, nämlich

für $\frac{\text{Alb}}{\alpha_1} = 1,2$ in 1,25%-Agar-Gel wie auch im Tiselius-Apparat,

für $\frac{\text{Alb}}{\alpha_2} = 1,5$ beidseits und

für $\frac{\text{Alb}}{\beta} = 2,1$ gegen 2,2.

Leitfähigkeit, Evaporation und Feldstärke. Die Leitfähigkeit von gepuffertem Agar-Gel ist nahezu dieselbe wie im verwendeten Puffersystem; in einem 1%-Agar-Gel mit Barbitursäurepuffer vom pH 8,6 und $\mu = 0,05$ verhält sich die Leitfähigkeit wie 32 zu 29 im Puffer⁴³; in einem 1,25%-Agar-Gel und demselben Puffersystem mit pH = 8,6 und $\mu = 0,1$ sind die Zahlen 64 und 60. Mit geringerer Ionenstärke des Puffersystems nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Proteine mehr zu als linear. Eine Pufferung von der Ionenstärke $\mu = 0,055$ ist die untere Grenze, indem bei noch kleineren Ionenstärken sich Bereiche von verändertem pH ergeben, demzufolge die Fronten der Proteinfractionen eine verzerrte Form annehmen. Bei einer Ionenstärke von 0,05 kann auch die Stromstärke hinreichend niedrig gehalten werden, so dass nachteilige Wirkungen der Stromwärme nicht zu erwarten sind. Beträgt nämlich die Feldstärke 6 V/cm, so erwärmt sich das Agar-Gel bereits mehrere Grade über Zimmertemperatur⁴³ und der Gewichtsverlust durch Evapora-

⁴⁰ E. L. BECKER, J. MUNOZ, C. LAPRESLE und L. LE BEAU, J. Immunol. 67, 501 (1951). – J. SALVINIEN, J. Chim. phys. 52, 741 (1955). – H. RUBINSTEIN, J. Immunol. 73, 322 (1954). – C. WILLIAMS und P. GRABAR, J. Immunol. 74, 158, 397, 404 (1955).

⁴¹ E. DARMOIS, C. R. Acad. Sci. Paris 227, 339 (1948).

⁴² A. CHRESTFIELD und F. W. ALLEN, Analyt. Chem. 27, 422 (1955).

⁴³ P. BURTIN, Rev. int. Hépat. 4, 641 (1954).

tion steigt auf 18% bei einer Versuchsdauer von 150 min. Beträgt die Feldstärke hingegen 5 V/cm bei einer Klemmspannung von 85 V Gleichstrom (siehe Angaben zur Technik), so sind besondere Kühlvorrichtungen überflüssig und es kann darauf verzichtet werden, in feuchter Kammer zu arbeiten. Evaporation und Leitfähigkeit bleiben während des ganzen Versuches nahezu konstant, so dass auch die Wanderungsgeschwindigkeit nicht abnimmt und die Weglänge (Trennstrecke) in erster Linie abhängig wird von der Versuchsdauer. Die Bedingungen sind somit grundlegend verschieden von jenen der Papier-Elektrophorese (MACHEBOEUF⁴⁴), wo jedes Proteinion unabhängig von der Auftragstelle schliesslich eine bestimmte Stelle auf dem Papierstreifen einnimmt. Für die Immunelektrophorese hat eine längere Trennstrecke den Vorteil, dass die einzelnen Präzipitationslinien besser in ihrem Verlauf und gegenseitigen Verhalten zu verfolgen sind. Die Erleichterung der Deutung des Ergebnisses ist hier wichtiger als die Versuchsdauer.

Kolloidchemie des Agar-Gel. Agar-Agar wird gewonnen aus den Florideenmembranen der Gelidium- und Gracilariarten. Es ist ein lineares Polysaccharid⁴⁵, dessen Untereinheiten aus 9 D-Galaktose-Resten bestehen, welche in 1,3-glykosidischer Bindung verknüpft sind⁴⁶. Nebenvaleanzbindungen halten die Makromoleküle zum Gelnetz zusammen. Bei Temperaturerhöhung werden diese labilen Sekundärvalenzen leicht gelöst und das Gel verflüssigt sich. Es entsteht mit heissem Wasser ein stabiles, lyophiles Hydrosol. Agar-Gel ist thermoreversibel; so sind seine Erweichungsprodukte vor und nach dem Gefrieren nicht verschieden, während Pektin-Gele sich nach dem Gefrieren verflüssigen. Für die Schwellung des Agar-Gels sind die polaren Gruppen, wie $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ und $> \text{C}=\text{O}$, als Hydratationszentren wichtig. Sie werden durch Salzionen abgeschirmt, so dass Agar in jeder Salzlösung weniger schwillt als wie in Wasser. Beim Geliertprozess steigt die Viskosität kurz vor der Ausbildung zum Gel stark an als Ausdruck für die zunehmende Vernetzung der Makromoleküle. Weitere Eigenschaften verändern sich jedoch bei der erfolgten Sol/Gel-Umwandlung nicht sprunghaft; so ändern sich Diffusion, elektrische Leitfähigkeit und die Dielektrizitätskonstante nicht wesentlich. Agar-Gel ist ausgezeichnet durch einen hohen Elastizitätsmodul und eine relativ geringe Verformbarkeit⁴⁷. In einer Reihe von Gelen gleichen Elastizitätsmoduls würde die Zerreihsfestigkeit in folgender Reihe zunehmen: Agar-Gel < Gelatine-Gel < Polyvinylalkohol-Gel < Pektin-Gel < Tamarindenschleim-Gel. Daraus leitet sich ab, dass die mittlere Länge der Fadenmoleküle im Pektin-

Gel grösser ist als im Agar-Gel. In der Tat gelingt die Ausführung der Elektrophorese noch gut in einem Pektin-Gel⁴⁸ von nur 0,5%. Die wässrige Phase macht hier somit 99,5% bis 99,8% aus! Die Gelierung wird durch Pektin-methyl-esterase bei Raumtemperatur und in Anwesenheit von Kalziumionen erreicht⁴⁸. Darin können Substanzen aufgetrennt werden wie Lysozym, die mit Agar Niederschläge bilden. Das Pektinergüst kann hinterher durch Pektinesterase unter Abspaltung von Methanol hydrolysiert werden⁴⁹; dadurch kann eine Elution oder Extraktion der Proteine aus bestimmten Bezirken umgangen werden⁵⁰.

Praktische Angaben zur Technik. a) *Die Vorbereitung des Agar-Gels.* Um gleichmässige Resultate zu erhalten, ist es vorteilhaft, sich stets derselben Marke von Agar, wie etwa Bacto-Agar der Firma Difco, zu bedienen. Von dieser werden 3 g in einem Weithals-Erlenmeyer-Kolben eingewogen und mit 20 ml destilliertem Wasser erst gut angerührt und zur Quellung gebracht; später werden unter allmählichem Erhitzen und gutem Rühren 180 ml Pufferflüssigkeit zugegeben. Wenn das Agar-Sol völlig homogen ist, filtriert man warm durch ein Nylonfiltertuch und bringt das Filtrat mit Puffer auf 200 ml. Von dem warmen Agar-Sol von 1½% werden in trockene Reagenzgläschen je 11 ml pipettiert und auf die erstarrende Oberfläche 2 Tropfen einer 5%-Merthiolatlösung gegeben. Nach dem Verkorken werden die Gläschen kühl und dunkel beiseitegestellt. Für den Puffer werden 29,34 g diäthylbarbitursäures Na, 19,42 g Na-Azetat und 180 ml 0,1 n HCl ad 3 l Wasser gelöst. Es ergibt sich ein pH von 8,6 bei einer Ionenstärke von 0,1. Als Unterlage für das Agar-Gel ist es vorteilhaft, die 16 × 4 cm Glasplättchen zu verwenden, die im Elphor-Auswertgerät dazu dienen, den transparentgemachten Papierstreifen einzulegen. Die Glasplättchen werden erst mit 96% Alkohol abgespült, auf einer Heizplatte erwärmt und einige Tropfen Agar-Sol auf ihrer Oberfläche verstrichen. Nach dem Eindunsten entnimmt man mit vorgewärmter Stabpipette einem der erwähnten Agar-Röhrchen 10 ml Agar-Sol (vgl. WUNDERLY und BUSTAMANTE⁵¹). Man richtet die Spitze der Pipette auf die Mitte des horizontal gelegten, heissen Glasplättchens und regelt die Ausflussgeschwindigkeit so, dass das Agar-Sol sich nach allen Seiten gleichmässig bis zum Glasrand ausdehnt. Nach dem Abkühlen hat man eine Gelschicht von 1,5 mm Dicke und spiegelglatter Oberfläche.

b) *Die Elektrophorese in Agar-Gel.* Entsprechend der von uns ausgearbeiteten Technik⁵¹ werden je ein Stücklein Whatman-Papier Nr. 17 (5 × 5 mm) in das aufzutrennende Serum und in eine Verdünnung desselben,

⁴⁴ M. MACHEBOEUF, J. DUBERT und P. REBEYROTTE, Bull. Soc. Chim. biol. 35, 346 (1953).

⁴⁵ W. G. JONES und S. PEAT, J. chem. Soc. 1942, 225.

⁴⁶ J. JONES und F. SMITH, Adv. Carbohydr. Chem. 4, 243 (1949).

⁴⁷ H. NEUKOM, Mitt. Agrikul. Chem. Inst. ETH. Zürich, 1949.

⁴⁸ P. GRABAR, W. NOWINSKY und B. GENERAUX, Nature 178, 430 (1956).

⁴⁹ J. SOLMS und H. DEUEL, Helv. chim. Acta 38, 321 (1955).

⁵⁰ P. GRABAR, Proc. III. Int. Congr. Biochem. Brüssel 1955, 37.

⁵¹ CH. WUNDERLY und V. BUSTAMANTE, Klin. Wschr. 35, 758 (1957).

1:6 (NaCl), getaucht. Die ausgiebig benetzten Papierchen werden auf die Mitte des Agar-Geles (quer zur Längsrichtung) so aufgesetzt, dass zwischen ihnen ein Abstand von 10 mm verbleibt. Ohne dass die Papierchen angedrückt werden, diffundiert das Serum rasch in das Agar-Gel. In die Mitte zwischen die beiden Papierchen und längs zum Agar-Plättchen wird mit doppelt gebogenem Blech eine kleine Rinne von 1 mm Weite gestanzt. Nach 30 min werden die Papierchen entfernt und über die Stelle ihrer Auflage 10 ml 0,86% NaCl fließen gelassen. Die Oberfläche des Gels muss alsbald völlig gleichmässig erscheinen. Dadurch besteht die Gewähr, dass bei der nachfolgenden Auswertung keine zurückhängenden Proteine an der Auftragsstelle einen Gradienten vortäuschen. Zwischen den Papierenden (siehe Abb. 1a), welche den Strom zuführen (und möglichst kurz zu halten sind), wird eine Stromdichte von 4,9 mA/cm (Breite: 4 cm) und eine Feldstärke von 3,5 V/cm (Distanz der Papierenden: 14 cm) angelegt.

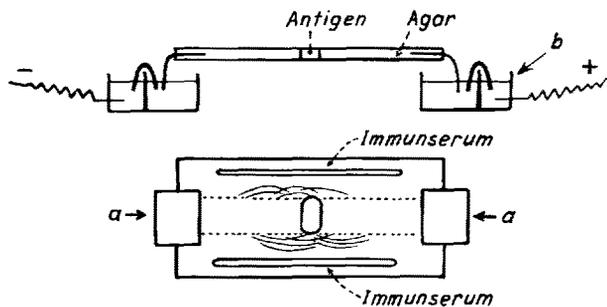


Abb. 1. Schema der Anordnung zur Immunelektrophorese.
a = Papiere zur Stromzuführung, b = Wannen mit Pufferlösung.

Als Elektroden dient Platindraht von der Länge der Elektrodengefässe; um pH-Änderungen zu vermeiden, strömt während der Elektrophoresedauer Pufferlösung langsam durch die Gefässe (siehe Abb. 1b). Um eine einwandfreie Trennung von Albumin und α_1 -Globulin zu erreichen (Abb. 2), ist es notwendig, die Stromverhältnisse möglichst genau einzuhalten. Wie neuerdings WIEME⁵² feststellte, war mit der bisherigen Technik die erwähnte Trennung nur unbefriedigend zu verwirklichen. Jedoch zeigen neuerdings die Ergebnisse von CLEVE und HARTMANN⁵³ an 8 Rheumatikerseren mit Immunelektrophorese in Agar-Gel die Wichtigkeit der 4 Präzipitatlinien im α_1 -Globulinbereich für die klinische Aussage.

Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, ist die Auftragsstelle nicht mehr sichtbar und es fehlt auch jedes Depot hitzedenaturierter Proteine. Die erreichte Auftrennung ist jener in Papier recht ähnlich und bildet eine gute Ausgangslage für die anschliessende Reaktion mit dem Antiserum. Nur wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, kann eine sichere Lokalisation der Präzipitatlinien ge-

währleistet werden. Wünscht man eine Kontrolle des Fortganges der Agar-Elektrophorese, so unterbricht man nach 4–5 h den Strom und legt die Agar-Plättchen in eine 2prozentige Lösung von Essigsäure. Nach einer Stunde sind die denaturierten Proteinfractionen gut zu erkennen. Für Weiterbehandlung siehe Abschnitt 4: Die Färbung. Über Zonenelektrophorese im Agar-Gel haben BOCKEMÜLLER und OERTER⁵⁴ berichtet.

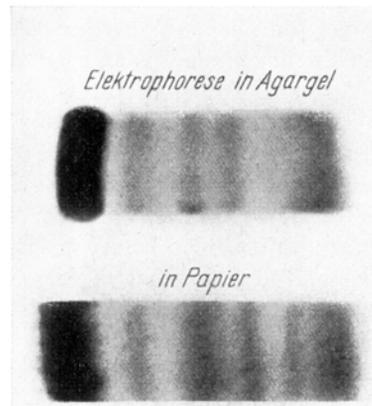


Abb. 2. (Aus CH. WUNDERLY und V. BUSTAMANTE, 1957)

c) Die Diffusion des Antiserums. Nach Stromunterbruch wird auf den Agar-Plättchen am oberen und unteren Ende ein kleines Stück vom Agar-Gel abgehoben und auf das Glas Leukoplaststreifen aufgeklebt. Auf ihnen vermerkt man Serum und Antiserum. Nun wird aus der bereits vorgestanzten Mittelrinne das Agar-Gel herausgehoben und an dessen Stelle 0,10 bis 0,15 ml des Antiserums bzw. der Antiserumverdünnung gleichmässig aus einer Mikropipette verteilt. Kaninchen-Antisera werden unverdünnt verwendet, während man Pferde-Antiserum⁵⁵ von hohem Titer 1:1 mit physiologischem NaCl verdünnen kann. Um der Diffusion Zeit zu lassen, werden die Agar-Plättchen für 2–3 Tage in eine feuchte Kammer mit konstanter Temperatur (18° sind optimal) gestellt. Anschliessend gelangen sie für 2 Tage in ein Bad von physiologischem NaCl, das man pro Tag zweimal wechselt. Man erreicht damit, dass die an der serologischen Reaktion nicht beteiligten Proteine eluiert werden und die Färbung der Präzipitatlinien nicht stören.

d) Die Färbung. Nach vollendeter Elution wird die Agar-Schicht mit einem Streifen von leichtbefeuchtem Filterpapier bedeckt. Dasselbe muss gleichmässig aufliegen. Etwa 20 cm über den bedeckten Plättchen dreht man eine Infrarotlampe an. Ein starker Luftstrom sorgt für rasche Evaporation und verhindert ein Ansteigen der Temperatur (höchstens handwarm).

⁵⁴ W. BOCKEMÜLLER und A. OERTER, Naturwiss. 43, 398 (1956); Z. anal. Chem. 156, 120 (1957).

⁵⁵ Pferde-Antiserum gegen Humanserum, normal, kann vom kommerziellen Dienst des Pasteur-Institutes in Paris bezogen werden. Das standardisierte Ergebnis mit Humanserum, normal, in der Immunelektrophorese ist mitgegeben.

⁵² R. J. WIEME, Rev. belge Path. 25, 62 (1957).

⁵³ H. CLEVE und F. HARTMANN, Klin. Wschr. 35, 334 (1957).

Tabelle I

Technik	Serummengeml	Immuns Serum (Pferd)ml	Versuchsdauer	
			Elektrophorese	Diffusion
Makromethode	0,05–0,20	0,05–0,07	4–5 h mit 3,5 V/cm	2–3 Tage
Mikromethode ⁵⁹	0,001	0,005	45 min mit 6 V/cm	½–24 h

Zugleich mit dem Wasser des Gels wandern auch die Salze der Puffersubstanzen in das Papier. Dies ist die Vorbedingung für einen glasklaren Agar-Film. Nach etwa 30 min rollen sich die Papierstreifen auf und lassen damit erkennen, dass die Evaporation beendet ist. Das getrocknete Agar-Gel wird unter dem Wasserstrahl von anhaftenden Partikelchen befreit und gelangt in das Farbbad.

Für die Färbung mit *Amidoschwarz* löst man in 900 ml Azetat-Puffer (60 g Eisessig + 13,6 g Na-Azetat · 3 H₂O in l) 1 g Amidoschwarz. Nach 60 min wäscht man den überschüssigen Farbstoff aus, indem man je 30 min in einem Bad von essigsauerm Methanol belässt (450 ml Methanol, 450 ml H₂O, 100 ml Eisessig).

Für die Färbung mit *Azokarmin*⁵⁶ löst man 0,5 g Azokarmin in 1 l Azetat-Puffer (830 ml H₂O, 20 ml Eisessig, 150 ml Glycerin). Nach 5 h im Farbbad wird die überschüssige Farbe abgespült und für 2 h in Azetat-Puffer/Glycerin gelegt (einmal erneuert). Nach dem Trocknen kann der Agar-Film vom Glas abgezogen und in dieser haltbaren Form aufbewahrt werden.

Nach der Elektrophorese in Agar-Gel können auch die *Lipoproteide*⁵⁷, *Glukoproteide*⁵⁸ und *Azetalphosphatide*⁵⁸ durch entsprechende Färbung sichtbar gemacht werden.

e) *Die Mikromethode.* Die Mikromethode zur Immunelektrophorese, wie sie von SCHEIDEGGER⁵⁹ ausgearbeitet wurde, vereinigt als hauptsächlichste Vorteile die auf 24 h abgekürzte Versuchsdauer und eine wesentlich kleinere Menge von benötigtem Immuns Serum. Wir entnehmen seiner Darstellung die obigen Vergleichszahlen⁵⁹ (s. Tabelle).

Das 2%-Agar-Gel enthält Veronal-Puffer vom pH 8,2 und von der Ionenstärke 0,1. Davon werden auf je 1 Objektträgerglas 2 ml erstarren gelassen; die Geldicke beträgt 1 mm. Bereits nach 30 min der Diffusion werden die ersten Präzipitatlinien sichtbar. Da hochwertige Antisera vom Pferd einen beträchtlichen Seltenheitswert besitzen, verdient die Mikromethode, insbesondere bei Serienuntersuchungen von klinischem Interesse, eine breitere Anwendung.

Neuerdings wurden auch Mikromethoden beschrieben von MONNIER und FISCHER⁶⁰ sowie von WIEME und RABAEY⁶¹. Um die Mukoproteine des Serums abzutrennen, führt GIRI⁶² eine zweidimensionale Agar-Elektrophorese durch; in der einen Richtung benützt er Veronal/Azetatpuffer vom pH 8,6 und anschliessend rechtwinklig dazu einen Milchsäure/Azetatpuffer vom pH 4,5.

f) *Aufzeichnung der Resultate.* Für die *photographische Wiedergabe der nichtgefärbten Präzipitatlinien* im Agar-Gel hat sich folgende einfache Technik am besten bewährt. Man füllt eine Porzellanwanne halb mit physiologischem NaCl und legt in der Dunkelkammer ein steifes photographisches Papier mit der Schicht nach oben auf den Grund der Wanne. Nun wird die Glasplatte mit dem Agar-Gel so aufgelegt, dass keine Luftblasen zwischen ihr und dem Papier bestehen. Für die Kontrolle der kurzen Belichtungszeit dient ein Belichtungsregler mit Uhrwerk. Das belichtete Papier wird in den Entwickler gelegt und unter Rotlicht möglichst kontrastreich entwickelt, gewaschen und fixiert. *Gefärbte Agar-Filme* bildet man auf Kontrastfilm ab. Die Papierkopien ergeben schwarze Linien auf hellem Grund.

Deutung des Ergebnisses. Da die Untersuchung des normalen menschlichen Serums⁶³ schon oft vorgenommen wurde, haben die Resultate (Stärke und Umfang der Präzipitatlinien) in bezug auf das jeweils angewandte Immuns Serum eine gewisse Standardisierung erfahren. Wie die übrigen serologischen Methoden ist auch die Immunelektrophorese mit der Unzulänglichkeit belastet, dass es unmöglich ist, Antisera herzustellen mit analoger Wirkungsbreite. Hier wird eine Grenze der biologischen Methoden sichtbar, wo die individuelle Spezifität des Tierorganismus die analytisch erreichbare Reproduzierbarkeit einengt. Daraus leitet sich ab, dass es ungleich wertvoller ist, von einem guten Immuns Serum eine grössere Menge zu besitzen, als von mehreren Antisera gesamthaft dasselbe Volumen. Schon diese quantitativen Überlegungen führen zu

⁶⁰ J. MONNIER und R. FISCHER, Bull. Soc. Chim. biol. 39, 145 (1957).

⁵⁶ J. URIEL und P. GRABAR, Ann. Inst. Pasteur 90, 427 (1956).

⁵⁷ J. URIEL und J. SCHEIDEGGER, Bull. Soc. Chim. biol. 37, 165 (1955). – J. URIEL und P. GRABAR, Bull. Soc. Chim. biol. 38, 1253 (1956).

⁵⁸ J. URIEL, P. GRABAR und CH. WUNDERLY, Clin. chim. Acta 2, 35 (1957).

⁵⁹ J. SCHEIDEGGER, Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955); Übersicht von Ergebnissen: C. R. IV^e Journées Biochimiques, Montpellier, Mai 1957.

⁶¹ R. J. WIEME und M. RABAEY, Naturwissenschaften 44, 112 (1957).

⁶² K. V. GIRI, Nature 179, 632 (1957); vgl. Naturwissenschaften 43, 448 (1956).

⁶³ E. MARTIN, J. J. SCHEIDEGGER, P. GRABAR und C. A. WILLIAMS, Bull. Acad. suisse Sci. méd. 10, 193 (1954). – C. WILLIAMS und P. GRABAR, J. Immunol. 74, 158, 397, 404 (1955). – F. SCHEIFFAHR, G. BERG und W. FRENGER, Klin. Wschr. 34, 134 (1956).

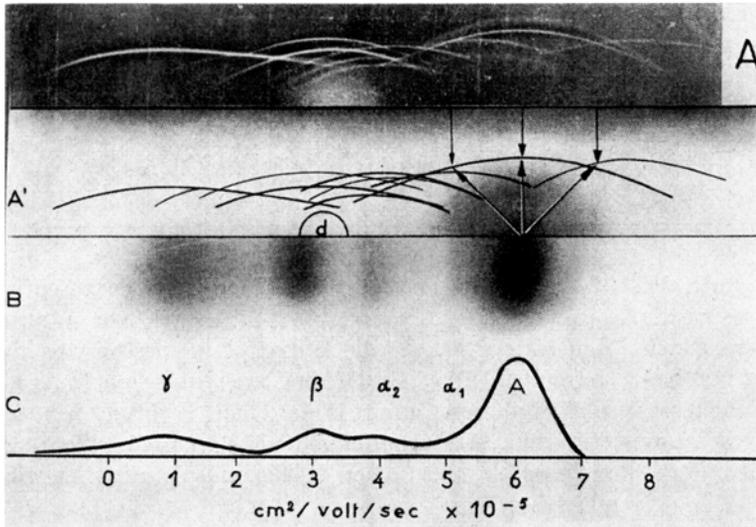


Abb. 3. Von oben nach unten: *A* Präzipitatlinien im Agar-Gel längs eines aufgetrennten Serums. *A'* Schema und Zuordnung der Linien. *B* Elektrophorese auf Papier.

C Elektrophorese nach TISELIUS desselben Serums und in demselben Puffer.
[Aus: P. GRABAR und C. A. WILLIAMS, *Biochim. biophys. Acta* 17, 67 (1955).]

der Überlegenheit des Pferdes als Produzent von Antiserum gegenüber den kleinen Laboratoriumstieren.

Auf Abbildung 4 werden die Ergebnisse der Immunelektrophorese (*A* und *A'*) gegenübergestellt jenen mit Papierelektrophorese (*B*) und freier Elektrophorese (*C*). Während in *B* und *C* eine Auftrennung in 5 Fraktionen stattfindet, gelingt es mit der Technik *A*, 16 bis 18 Komponenten sichtbar zu machen. Beginnt man deren Beschreibung nach Massgabe ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, so stehen noch vor dem Serumalbumin ein oder zwei kleinere Komponenten, welche von GRABAR⁵⁰ mit ϱ bezeichnet werden. Offenbar ist ihr Gehalt so gering, dass sie mittels Papierelektrophorese im Serum zumeist nicht deutlich, dagegen im menschlichen Liquor cerebros. mehrfach beobachtet werden konnte (als einzelne Unterfraktion). Auf der Höhe des Serumalbumins erscheint eine Präzipitatlinie, welche recht verschieden deutlich ausfällt. Es ist dies eine Folge des hohen Albumingehaltes bzw. des Antigenüberschusses; die Präzipitatlinie kann sich verbreitern bis zur Verdoppelung oder zufolge von Auflösung völlig verschwinden. Unter der Albuminlinie befindet sich noch die kleinere Linie eines Proteins, das in der Fraktion V von COHN nicht enthalten ist; der Nachweis gelang auf Grund der Absorption des Immunserums mittels dieser Fraktion. Insofern die *Absorption des Immunserums* mit einem hinlänglich gereinigten Protein vorgenommen wird, gelingt auf diese Weise der *Identitätsnachweis* neben weiteren Proteinen. Darin kommt die Wichtigkeit von stetig verbesserten präparativen Methoden⁶⁴ zum Ausdruck. Umgekehrt erlaubt die Immunelektrophorese eine besonders genaue

*Prüfung auf Einheitlichkeit gefällter Fraktionen*⁶⁵. Auf der Höhe des α_1 -Globulins werden bei guter Auftrennung nicht weniger als 3 Präzipitatlinien sichtbar, im Gebiet des α_2 -Globulins sogar bis deren 5. Davon bezeichnet die eine das Haptoglobulin⁶⁶, dessen Hämoglobinkomplex mit der Beweglichkeit von β -Globulin⁶⁷ wandert. Im Bereich des β -Globulins werden 3 Linien sichtbar, wovon 2 einander recht benachbart sind. Diejenige mit der langsameren Diffusion bezeichnet das Siderophilin; die grosse Feinheit der Linie lässt auf einen kleinen Gehalt schliessen; der färbereische Nachweis gelingt nur nach entsprechender Anreicherung. Im normalen Serum findet sich stets die Linie des β_2A . Daneben befindet sich noch ein β_2M , das normalerweise nur in sehr kleiner Menge vorhanden ist, um in Fällen von Makro-

globulinämie um so stärker hervorzutreten. Hier wird sichtbar, dass die Zuteilung von Präzipitatlinien zu elektrophoretisch getrennten Fraktionen nicht immer völlig eindeutig erfolgen kann, da damit noch Gehalte nachgewiesen werden, die zur Bildung einzelner Gradienten nicht ausreichen, sondern in anderen Fraktionen mitenthalten sind. So überschreitet auch die einzige Linie im γ -Globulingebiet den Bereich dieser Fraktion und reicht oft bis zu dem α_2 -Globulin. Aus dem flachen, lang ausgedehnten Kurvenverlauf kann man schliessen, dass γ -Globulin eine ganze Anzahl von Proteinen umschliesst mit derselben Spezifität als Antigen; es sind somit in der β_1 -Globulinzone und manchmal selbst in der α_1 -Globulinzone Proteine vorhanden, deren immunologische Eigenschaften identisch sind mit γ -Globulin, welche jedoch in der Elektrophorese eine abweichende Beweglichkeit aufweisen. Aus dem Gesagten ergibt sich die bedeutende Verfeinerung der Auftrennung der Serumproteine mittels der Immunelektrophorese. Gleichzeitig ist es ein Hinweis auf *die Heterogenität der mit einfacher Elektrophorese aufgetrennten Fraktionen*. Ein gültiger Beweis dafür wurde durch folgendes Experiment erbracht⁶⁸. Ein Agar-Gel, in welchem in üblicher Weise ein normales menschliches Serum aufgetrennt worden war, wurde durch Querteilung in 50 gleich grosse Felder geteilt; die Agar-Stückchen eines jeden Feldes wurden erneut der Agar-Elektrophorese unterworfen und darauf mit einem Pferde-Immunserum ge-

⁶⁵ C. A. WILLIAMS, II, *Coll. Bruges 1954*, 57.

⁶⁶ P. BURTIN, P. GRABAR, G. BOUSSIER und M. F. JAYLE, *Bull. Soc. biol.* 36, 1029 (1954).

⁶⁷ M. JAYLE, G. BOUSSIER und J. BADIN, *C. R. II. Congr. Biochim. Paris 1952*, 183.

⁶⁸ P. GRABAR, ⁵⁰: C. WILLIAMS und P. GRABAR, ⁶³.

⁶⁴ H. E. SCHULTZE, *Z. Elektrochem.* 60, 262 (1956); II. *Coll. Bruges 1954*, 83.

Tabelle II

Aufnahme Abbildung 4	a	b	c	d	e	f	g	h	i
Vol. Antigene mm ³	1	1	1	1	1	1/2*	1/4*	1/6*	1/8*
Vol. Immuneserum mm ³	1	2	3	4	5	5/5	5/5	5/5	15/5
Verhältnis.	1/1	1/2	1/3	1/4	1/5	1/10	1/20	1/30	1/80

* sind entsprechende Serumverdünnungen mit physiologischem NaCl.

prüft. Auch in dieser Größenordnung gelangen einwandfreie Präzipitatlinien sowie der Nachweis der obenerwähnten Komponenten⁶⁹; einzig das Albumin hatte sich auf Grund seiner rascheren freien Diffusion etwas gegen die langsamer wandernden Fraktionen verlagert.

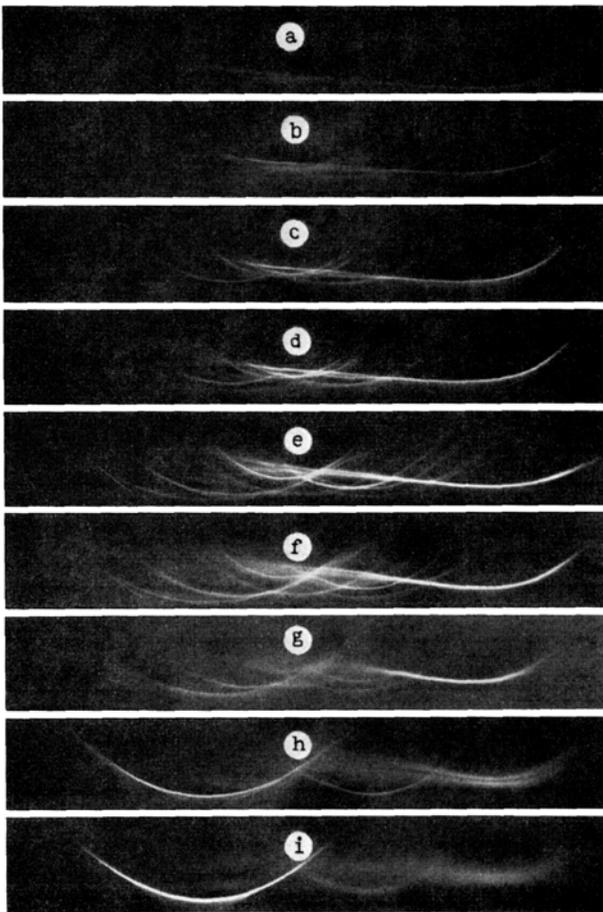


Abb. 4. Variation der relativen Gehalte der Komponenten. Von oben nach unten: Überschuss des Antigens, optimale Verhältnisse, Überschuss an Antiserum. [Aus: J. J. SCHEIDEGGER, Int. Arch. Allergy, N. Y. 7, 103 (1955).]

Die Immunelektrophorese ermöglicht es, auch die Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Antikörper zu bestimmen. Dafür wird erst das zu prüfende Immuneserum aufgetrennt und die Reaktion im Agar

mit entsprechenden Antigenen verfolgt. Auf diese Weise wurde der Nachweis erbracht⁶⁸, dass im Immuneserum vom Pferd Antikörper mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit vorhanden sind oder Antikörper von derselben Spezifität jedoch von abweichender Beweglichkeit.

II. Ergebnisse mit Immunelektrophorese. An den Beginn dieses Abschnittes stellen wir eine Arbeit, in welcher der Einfluss einer systematischen Veränderung des Verhältnisses von Antigen/Antikörper zur Darstellung gelangt. SCHEIDEGGER⁵⁹ hat diese Gehalte in der obigen Tabelle zusammengestellt.

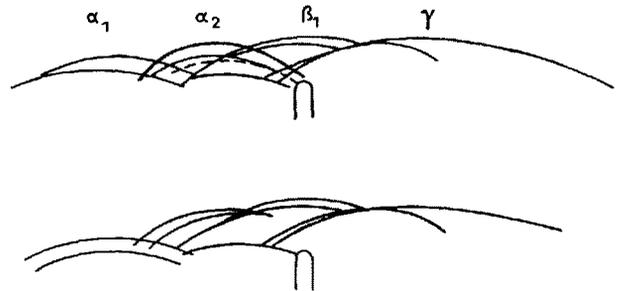


Abb. 5. Oben: Präzipitatlinien mit Antiserum, Mensch, normal. Unten: Linien mit demselben Serum, jedoch nach Absättigung mit Haptoglobin. Die Linie, welche verschwindet, ist oben gestrichelt. [Aus: P. BURTIN, P. GRABAR, Mlle G. BOUSSIER und M. F. JAYLE, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 1029 (1954).]

Neun Proben von normalem menschlichem Serum stehen in abgestuftem Verhältnis 9 Proben eines entsprechenden Pferde-Antiserums (Mensch) gegenüber. Es genügt somit eine Variation des Verhältnisses von 1/1 bis 1/80, um sehr erhebliche Veränderungen der Präzipitatlinien sichtbar werden zu lassen (Abb. 5).

Während auf a und b, also im Gebiet des Antigenüberschusses, als erste Linie diejenige des γ -Globulins in Erscheinung tritt, kommen in c und d weitere Linien von Globulinunterfraktionen hinzu. Das Zustandekommen dieser Präzipitatlinien ist wahrscheinlich auch von der Löslichkeit des Antigens abhängig; sie ist bei Albumin sehr viel grösser als bei γ -Globulin (WILLIAMS⁷⁰). In d wird gut sichtbar, wie die γ -Globulinlinie weit in andere Bereiche hineingreift und eine ausgesprochen asymmetrische Form aufweist (GRABAR⁷¹).

⁷⁰ C. A. WILLIAMS, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 1407 (1954).

⁷¹ P. GRABAR in: Les γ -globulines et la médecine des enfants (Paris 1955), S. 15.

⁶⁹ P. GRABAR, Arch. Sci. biol., Bologna 39, 589 (1955); Thérapie 9, 163 (1954).

Die Heterogenität der γ -Globuline, wie sie in dieser langausgedehnten Linie zum Ausdruck kommt, wurde auch bewiesen durch die Immunoelktrophorese eines Pferde-Antiserums (Mensch); dabei ergaben sich Antikörper mit verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit, wenn erst das Antiserum elektrophoretisch aufgetrennt wurde und verschiedene hochgereinigte Proteine seitlich hindiffundierten. Mit dem Verhältnis von $1/5$, wie es in e verwirklicht ist, wird das Optimum erreicht, in welchem die grösste Anzahl von Linien sichtbar wird. Ein Zunehmen des Antiserum-Anteils ($f-i$) führt zu verwaschenen, ja teilweise wieder aufgelösten Linien der Globuline. Da im freien Antikörper die Löslichkeit bedingt wird durch die Attraktion von Wasserdipolen seiner polaren Gruppen, ist anzunehmen, dass eine Löslichkeitsverminderung eintritt, wenn diese Gruppen durch die Bindung mit Antigenen abgesättigt werden⁷². Ist diese Absättigung zufolge von Antikörperüberschuss (Abb. 4 h und i) nur teilweise verwirklicht, so genügt der restliche Wassermantel, um das Präzipitat zu lösen. In f und g wird die Linie des ρ sichtbar. Im Maximum des Antiserum-Überschusses bleibt als einzige Linie diejenige des Albumins, ebenfalls übergreifend in den Bereich des α -Globulins. Der Reihenversuch zeigt, dass der Tierorganismus nicht in einfacher Proportion Antikörper entstehen lässt nach Massgabe der Antigene im injizierten Serum. Die Methode zeichnet den Weg vor für die systematische Untersuchung der Variabilität der Antigene, der Spezies, der Individuen, sowie der Dosierung und Applikationsweise der Antigene und der Begleitfaktoren im physiologischen und pathologischen Stoffwechsel.

Ähnlich wie das γ -Globulin des menschlichen Serums Objekt einzelner immunochemischer Studien wurde, konnte auch das β -Lipoprotein im Blutplasma untersucht werden. Hierfür verwendeten KORNGOLD und LIPARI⁷³ die nach der Cohnmethode 10 gewonnenen Fraktionen I + II + III, IV + V, den NaCl-löslichen Anteil von III sowie Vollplasma, das durch Flotation in der Ultrazentrifuge bei der Dichte von 1,063 g/ml vom Lipoprotein getrennt wurde. In Ouchterlony-Gelplatten wurden in die zentral angeordneten Stanzlöcher der Agar-Schicht Immunsere vom Kaninchen gegen die Fraktion III (COHN) gegeben. An den Diffusionsgrenzen bildeten sich Präzipitatlinien, von denen sich die lipoproteinhaltigen mit Sudanschwarz selektiv färben liessen. Die Plasmafraktionen II (IV + V), VI und der NaCl-lösliche Anteil von III erwiesen sich als lipoproteinfrei. Wiederum war die Reinheit der ausgefällten Fraktionen Voraussetzung, um die Beeinflussung der serologischen Reaktion durch Begleitprotein ausschliessen zu können. In der Immunoelktrophorese wird eine schwache Präzipitatlinie sichtbar, welche dem β_2 -Globulin zugeschrieben wird. Jedoch ist es methodisch vorteilhaft, ein Antiserum

zu verwenden, das erst mit γ -Globulin abgesättigt wurde⁷⁴. Die Gruppe der β -Globuline bildet zumeist 4 Präzipitatlinien, von welchen 2 eine ähnlich rasche Diffusion zeigen und sich manchmal überdecken. Eine weitere Linie ist nur schwach sichtbar und fehlt oft auch ganz, da wenig Antikörper in dem von der Gruppe GRABAR verwendeten Immunsere vom Pferd Nr. 31⁷⁴ vorhanden sind. Gleichwohl konnte dieses β -Globulin von GRABAR⁷⁵ als *Siderophilin* identifiziert werden. Dieses metallbindende Globulin wurde von KOEHLIN⁷⁶ als Fraktion IV-7,2 mit einer Reinheit von 90-95% und einer Ausbeute von 0,42 g pro 1 Plasma durch Fällung mit Äthanol isoliert; sein Molekulargewicht beträgt 90000, und es werden 2 Atome Fe/Mol (= 0,13%) gebunden. Die Immunoelktrophorese gestattete die genaue Lokalisation des Siderophilins; 200 μ g eines kristallisierten Präparates⁷⁷ wurden in 0,05 ml von normalem Serum gelöst und in üblicher Weise aufgetrennt⁷⁵; für die spezifische Präzipitation diente 1 ml Pferde-Antiserum total (Mensch). Vorversuche hatten ergeben, dass diese Menge etwa 150 μ g des Präparates⁷⁷ präzipitiert. In der Folge zeigte sich eine einzelne Linie im Bereich der β_1 -Globuline; die Identität wurde nachgewiesen durch die Reaktion mit einem Immunsere, dessen homologe Antikörper abgesättigt waren. Die Darstellung des erforderlichen Kaninchen-Antiserums haben GRABAR und BURTIN⁷⁸ beschrieben.

Neuerdings wurde durch URIEL, GÖTZ und GRABAR⁷⁹ mittels Immunoelktrophorese auch das *Ceruloplasmin* lokalisiert und das Kupfer durch kolorimetrische Mikromethode (Alizarinblau) bestimmt. Die beiden Ceruloplasmin-Präparate waren aus normalem, menschlichem Serum isoliert worden. Ihre Wanderung führt sie in den Bereich des α_2 -Globulins. Bei einem angenommenen Molekulargewicht von 155000 werden 6 Atome Kupfer pro Mol gebunden.

Auch GELL⁸⁰ hat mittels Immunoelktrophorese das Verhalten von γ -Globulin, Ceruplasmin und Siderophilin gegenüber Antisera geprüft. Seine Ergebnisse bestätigen die obenerwähnten Lokalisationen.

Für die Untersuchung des *Haptoglobins* stand ein Präparat⁸¹ von hoher Reinheit zur Verfügung (Verunreinigung 1%); sein Molekulargewicht ist 85000 und der Hexosegehalt 11,3%, davon sind 5,7% Hexosamin. Seine Wanderungsgeschwindigkeit war mit Papierelktrophorese als analog wie α_2 -Globulin gefunden worden⁸¹, was die Immunoelktrophorese durch BURTIN, GRABAR, BOUSSIER und JAYLE⁸² bestätigte. Die

⁷⁴ P. GRABAR und P. BURTIN, Presse méd. 63, 804 (1955).

⁷⁵ P. GRABAR, Ann. Acad. Sci. fenn., II. Chemica 1955, 401.

⁷⁶ B. A. KOEHLIN, J. chem. Soc. 74, 2649 (1952).

⁷⁷ Behringwerke Marburg a. d. L. (Prof. H. SCHULTZE).

⁷⁸ P. GRABAR und P. BURTIN, Bull. Soc. Chim. biol. 37, 797 (1955).

⁷⁹ J. URIEL, H. GÖTZ und P. GRABAR, Schweiz. med. Wschr. 1957, 431.

⁸⁰ P. G. GELL, J. clin. Path. 10, 67 (1957).

⁸¹ M. F. JAYLE und G. BOUSSIER, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 959 (1954).

⁸² P. BURTIN, P. GRABAR, G. BOUSSIER und M. F. JAYLE, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 1029 (1954).

⁷² W. C. BOYD, J. exper. Med. 75, 407 (1942).

⁷³ L. KORNGOLD und R. LIPARI, Science 121, 107 (1955).

Haltbarkeit der Lösungen in den üblichen Puffersystemen ist beschränkt. Um ein absorbiertes Antiserum zu gewinnen, wurde 1 ml des Pferde-Antiserums total (Mensch) mit 400 μg des Haptoglobin-Präparates vermischt und das spezifische Präzipitat abzentrifugiert. Mit dem Antiserum-Rest fehlte eine Linie im α_2 -Globulinbereich, welche sich durch eine mittlere Diffusionsgeschwindigkeit auszeichnet (Abb. 6).

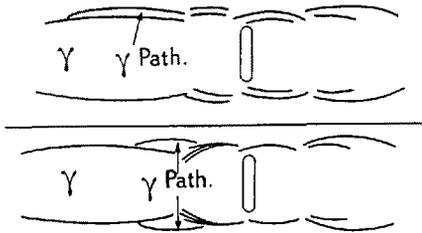


Abb. 6. Längs der Mittellinie diffundierte ein Antiserum, welches erst mit Bence-Jones-Uroprotein abgesättigt worden war. [Aus: P. BURTIN, L. HARTMANN, R. FAUVERT und P. GRABAR, Rev. franç. Et. clin. biol. 1, 17, 175 (1956).]

Die Versuche ergeben, dass sowohl *Haptoglobin wie Siderophilin unabhängige Proteine im menschlichen Blutserum sind*. Auch solche Körperflüssigkeiten, die ausgesprochen proteinarm sind, wie Liquor cerebrospinalis und Synovialflüssigkeit, wurden von GAVRILESCO, COURCON, HILLION, URIEL, LEWIN und GRABAR⁸³ im Agar-Gel aufgetrennt und anschliessend serologisch untersucht.

In umfassender Weise wurden die Proteine der menschlichen *Synovial-Flüssigkeit* (normal, rheumatische Arthritis, Neuroarthropathie, Trauma) von SCHMID und MACNAIR⁸⁴ untersucht. Für die Immunoelktrophorese wurde ein Boratpuffer von 1T 0,07 Mol $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ und 2T 0,07 Mol H_3BO_3 verwendet; er besitzt ein pH von 8,6 und $\tau/2 = 0,07$. In 2%-Agar-Gel betrug die Trenndauer 17 h bei 180 V und 40 mA. In der Folge ergaben sich analoge Präzipitatlinien wie bei Serumprotein; die Identität wurde bei Albumin und γ -Globulin erbracht. Das *Linsenprotein des Menschen* wurde von WIEME und RABAËY⁸⁵ sowie WIEME und KAMINSKI⁸⁶ im Agar-Gel untersucht und dabei in mehrere Proteinfraktionen aufgetrennt.

Ebenso gelang es GRABAR und BURTIN⁸⁷ sowie BURTIN, HARTMANN, FAUVERT und GRABAR⁸⁸, im Blutserum von Patienten mit ausgedehnter Dysproteinämie (Myelom, sekundäres Knochenkarzinom, Lipidnephrose) mit Immunoelktrophorese wesentliche Abweichungen zu finden vom gewohnten Bild normaler Sera. Während bei weiteren Hyperglobulinämien die

Linie der γ -Globuline gesamthaft verstärkt erscheint, ist sie es bei Myelom nur abschnittsweise. In einigen der mit Immunoelktrophorese untersuchten 30 Fälle wurden auch abnorme Linien im Gebiete der γ -Globuline sichtbar (Abb. 6).

In einem Falle (Abb. 6 oberes Serum längs Mittellinie) konnte die pathologische Linie des γ -Globulins zum Verschwinden gebracht werden, wenn ein Immunsersum hineindiffundierte, das vorgängig mit Bence-Jones-Uroprotein abgesättigt worden war. Eine weitere Anomalie zeigt sich im β_2 -Globulin-Sektor, wo die Linie bald ganz ausfällt, bald aussergewöhnlich scharf und krummlinig erscheint. Die Endgruppenanalyse von Myelomprotein durch PUTNAM⁸⁹ weist auf eine Uneinheitlichkeit des chemischen Aufbaues hin. Ähnlich wie die neuen Studien über Myelomproteine mit Agar-Diffusionstest⁷³ und Ultrazentrifuge⁹⁰ erweisen auch die besprochenen Untersuchungen in qualitativer Weise das *Vorliegen anomaler Proteine*. Es wurde dies neuerdings bestätigt durch die Arbeit von MARTIN und SCHEIDEGGER⁹¹. Somit wurde ein Fortschritt erzielt gegenüber den Ergebnissen mit Papier-Elektrophorese, wo zumeist nur extreme Gehaltserhöhungen einzelner Globulinfraktionen beobachtet werden. Bei der Untersuchung von Sera von Patienten mit *Lipoid-Nephrose*⁸⁷ war erwartungsgemäss die Hauptlinie der Lipoproteide verstärkt, dagegen wurden *keine neuen Proteinlinien* beobachtet. Aus der Klinik kennt man öfters die völlige Normalisierung einer Nephrose, dagegen nicht diejenige eines Myeloms oder einer Makroglobulinämie. Es scheint daraus hervorzugehen, dass der Organismus ausserstande ist, eine gestörte Proteingenesse wieder rückgängig zu machen.

Seitdem WALDENSTRÖM 1948 erstmals die *Makroglobulinämie* beschrieben hat, sind die Arbeiten über diese Paraproteinämie nicht abgebrochen. Ultrazentrifugale Studien ergaben, dass im Kreislauf der Patienten im Mittel bis zu 28% des Plasmaproteins ein Teilchengewicht von 20 bis 30 Svedberg-Einheiten (S) aufweisen. Physiologischerweise enthält Serumprotein nur 2-4% mit dem Teilchengewicht von 20 S. REGNIERS, WIEME, WUNDERLY und BURTIN⁹² untersuchten sodann einen Fall von Makroglobulinämie mit Immunoelktrophorese und dem Agar-Plattentest. 66% des Serumproteins besass über 15 S, davon 14% 23-32 S. Die Immunoelktrophorese ergab immunchemische Anomalien im Bereiche der γ -Globuline. Neuerdings ermöglichte eine Zusammenarbeit von BURTIN, HARTMANN, HEREMANS, SCHEIDEGGER, WESTENDORP-BOERMA, WIEME, WUNDERLY und GRABAR⁹³ die Unter-

⁸³ K. GAVRILESCO, J. COURCON, P. HILLION, J. URIEL, J. LEWIN und P. GRABAR, Bull. Soc. Chim. biol. 37, 803 (1955).

⁸⁴ K. SCHMID und M. MACNAIR, J. clin. Invest. 33, 319 (1954).

⁸⁵ R. J. WIEME und H. RABAËY, III. Coll. Bruges 1955, 157.

⁸⁶ R. J. WIEME und M. KAMINSKI, Bull. Soc. Chim. biol. 37, 247 (1955).

⁸⁷ P. GRABAR und P. BURTIN, Presse méd. 63, 804 (1955).

⁸⁸ P. BURTIN, L. HARTMANN, R. FAUVERT und P. GRABAR, Rev. franç. Et. clin. biol. 1, 17, 175 (1956).

⁸⁹ F. W. PUTNAM, J. cell. comp. Physiol. 47, 17 (1956).

⁹⁰ M. PETERMANN und M. HAMILTON, Cancer 9, 193 (1956).

⁹¹ E. MARTIN und J. J. SCHEIDEGGER, Schweiz. med. Wschr. 1957, 439.

⁹² P. REGNIERS, R. WIEME, CH. WUNDERLY und P. BURTIN, Schweiz. med. Wschr. 86, 1140 (1956).

⁹³ P. BURTIN, L. HARTMANN, J. HEREMANS, J. SCHEIDEGGER, F. WESTENDORP-BOERMA, R. WIEME, CH. WUNDERLY und P. GRABAR, Rev. franç. Et. clin. biol. 2, 161 (1957).

suchung von 26 Makroglobulinsera und 7 isolierten Makroglobulinen mit Immunelektrophorese. Bei manchen Sera wurden im γ -Globulinbereich Anomalien beobachtet. Hierzu ist zu bemerken, dass die Immunelektrophorese die einzige Methode darstellt, welche den Beweis erlaubt, dass die atypischen Globuline bereits im nativen Zustande vorhanden sind. Neuerdings wurde auch die Möglichkeit erörtert⁹⁴, ob das Agar-Gel-Netz die Teilchen von Makroglobulin stärker in ihrer Bewegung hemmt als Fibrinogen und noch ausgesprochener als Albumin. Eine interessante Anwendung der von SCHEIDEGGER entwickelten Mikromethode⁵⁹ hat der Genannte gemeinsam mit MARTIN und RIOTTON⁹⁵ gemacht; es wurde das Protein von menschlichem Fötalblut untersucht in der Altersstufe von 8 bis 40 Wochen. Bis zur 12. Woche ergeben sich nur 5 Präzipitatlinien an Stelle von 18 beim Serumprotein des Erwachsenen; es sind dies die Vorfraktion ρ , Albumin, je ein α_1 - und ein β -Globulin. Im abschliessenden Zeitabschnitt erscheinen eine zweite Linie im Bereich der α_2 -Globuline, ebenso im α_1 - und β -Bereich; später eine dritte und vierte α_2 -Linie, eine dritte β -Linie und verspätet erst die γ -Globulinlinie. Bei der Geburt fehlen noch die Linien von Fraktion β_2 sowie eine weitere im α_2 -Bereich. Somit ist auch Nabelschnurblut noch inkomplett in qualitativer Hinsicht, was mit Papierelektrophorese nicht nachweisbar ist⁹⁶. Ebenfalls mit der Mikromethode haben CLEVE und HARTMANN⁵³ 8 Rheumatikerseren untersucht. Von den 4 Präzipitatlinien des α_1 -Globulins war diejenige des niedermolekularen, kohlenhydratreichen Säureproteides besonders deutlich. Dagegen konnte das C-reaktive-Protein (CRP) mit einem CRP-Antiserum nicht lokalisiert werden. Dasselbe gelang BUSTAMANTE, ARINO und MANUEL Y PINIÈS⁹⁷ und wurde von ihnen als im Bereich der γ -Globuline wandernd gefunden.

LAPRESLE⁹⁸ untersuchte das immunchemische Verhalten von Abbauprodukten des menschlichen Albumins mit Immunelektrophorese und Agar-Plattentest (OUCHTERLONY). Dazu wurde Serumalbumin mit Milzextrakt (Kaninchen) enzymatisch abgebaut. Die Immunelektrophorese ergab, dass die Antigenstruktur des menschlichen Albumins aus 3 spezifisch verschiedenen Anteilen besteht. MARIE KAMINSKY⁹⁹ untersuchte die Antigenstruktur von Eiereiweiss, Ovalbumin, Conalbumin, Ovomucid und Lysozym mittels Immunelektrophorese und dem Agar-Plattentest (OUCHTERLONY). In

der Folge erwies sich Ovomucid, mit Äthanol gefällt¹⁰⁰, als elektrophoretisch homogen, zeigte jedoch im Plattentest zwei Komponenten. Eiereiweiss enthält drei Fraktionen von Ovoglobulinen, welche, nach Massgabe ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, wiederum je 2–3 Linien entstehen lassen.

Untersuchungen mittels Papierelektrophorese¹⁰¹ hatten ergeben, dass die Agglutinine des menschlichen Blutserums in der Fraktion der γ -Globuline, insbesondere der γ_1 -Globuline, lokalisiert sind. Die Anti-Rh-Antikörper wurden, in früheren Arbeiten mit Konvektions-Elektrophorese, auch unter den α - und β -Globulinen gefunden¹⁰². Daraufhin unternahm FAURE, FINE, SAINT-PAUL, EYQUEM und GRABAR¹⁰³ eine entsprechende Studie mit Immunelektrophorese. Dazu wurden die zu prüfenden Sera in einfacher Agar-Elektrophorese über 12 cm Länge aufgetrennt; dieser Bereich des Agar-Gels wird in 12 Abschnitte von je 1 cm Breite aufgeschnitten. Aus den 12 Agar-Segmenten wird das Protein mit physiologischem NaCl eluiert und in der Zentrifuge von Agar-Resten abgetrennt. Mit der überstehenden Flüssigkeit werden Erythrozyten-Suspensionen reagieren gelassen, welche das Antigen enthielten, dessen Antikörper gesucht ist. Die aufgetrennten Sera enthielten: Isoagglutinine anti-A, Iso-Immuneagglutinine anti-A und anti-B, Iso-Immuneagglutinine anti-Rh (C + D), sowie Cryoagglutinine in einem Fall von hämolytischer Anämie und zwei Fällen von infektiöser Mononukleose. Als Resultat könnten die Isoagglutinine anti-A und anti-B in den rasch wandernden Anteilen der γ -Globuline sowie in den β_1 - und β_2 -Globulinzonen lokalisiert werden; dabei verhalten sich die natürlichen und die Immun-Antikörper nicht verschieden. Auch die indirekte Reaktion von COOMBS erfährt durch die Immunelektrophorese eine wertvolle Präzisierung¹⁰³.

Die antigene Wirkung synthetischer Polypeptide wurde von STAHMANN, TSUYUKI, WINKE, LAPRESLE und GRABAR¹⁰⁴ mittels Immunelektrophorese und dem Ouchterlony-Test untersucht. Die Polypeptide wurden synthetisiert¹⁰⁵ aus Leucin, Phenylalanin, Glutaminsäure und Lysin; darauf wurden sie an ein homologes Protein gekuppelt, das Serumalbumin vom Kaninchen, und ebenso an ein heterologes Protein, das Serumalbumin vom Rind. Durch entsprechende Injektionsfolgen mit je 4 Kaninchen wurden Immunsere ge-

¹⁰⁰ E. FREDERICQ und H. DEUTSCH, J. biol. Chem. 181, 499 (1949).

¹⁰¹ B. JANKOVIC und H. KRIJNER, Nature 171, 982 (1953). – R. PAYNE und Q. DEMING, J. Immunol. 73, 81 (1954).

¹⁰² J. HILL, S. HABERMAN und R. GUY, Amer. J. clin. Path. 19, 134 (1949). – J. CANN, R. BROWN, J. KIRKWOOD, P. STURGEON und D. CLARKE, J. Immunol. 68, 243 (1952).

¹⁰³ R. FAURE, J. FINE, M. SAINT-PAUL, A. EYQUEM und P. GRABAR, Bull. Soc. Chim. biol. 37, 783 (1955).

¹⁰⁴ M. STAHMANN, H. TSUYUKI, K. WEINKE, C. LAPRESLE und P. GRABAR, C. R. Acad. Sci. 241, 1528 (1955).

¹⁰⁵ M. GREEN und M. STAHMANN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. 83, 852 (1953). – R. RICE, M. STAHMANN und A. ALBERTY, J. biol. Chem. 209, 105 (1954).

⁹⁴ R. WIEME, Rev. belge Path. 25, 62 (1957).

⁹⁵ J. SCHEIDEGGER, E. MARTIN und G. RIOTTON, Schweiz. med. Wschr. 86, 224 (1956).

⁹⁶ R. CASPANI, M. NEGRI und C. STICCA, Minerva paediatr. 5, 67 (1953).

⁹⁷ V. BUSTAMANTE, J. ARINO und L. MANUEL Y PINIÈS, Presse méd. 65, 313 (1957).

⁹⁸ C. LAPRESLE, Ann. Inst. Pasteur 89, 654 (1955).

⁹⁹ M. KAMINSKY, J. Immunol. 75, 367 (1955); Bull. Soc. Chim. biol. 36, 79, 279, 291 (1954); II. Coll. Bruges 1954, 69. – M. KAMINSKY und J. DURIEUX, Bull. Soc. Chim. biol. 36, 1037 (1954).

wonnen. Die mit den letzteren durchgeführte Immunelektrophorese ergab einzelne Präzipitatlinien, als Beweis der Homogenität der Antigene. Auf Grund spezifischer Absorption konnten drei Antikörper im Antiserum (Serumalbumin, Rind/Polypeptide) nachgewiesen werden; die eine Linie entspricht dem heterologen Albumin, eine weitere dem entsprechenden

analyse¹⁰⁷ durch Immunelektrophorese zeigte im Restplasma unverändert das Voralbumin ρ , Albumin, eine α_1 -, zwei α_2 -Fraktionen, die als Siderophilin identifizierte β_1 -Komponente sowie γ -Globulin. CINADER und PEARCE¹⁰⁸ trennten in Agar-Gel Ribonuklease in die Komponenten A und B auf; anschliessend erfolgte die Diffusion von Ribonukleaseantiserum.

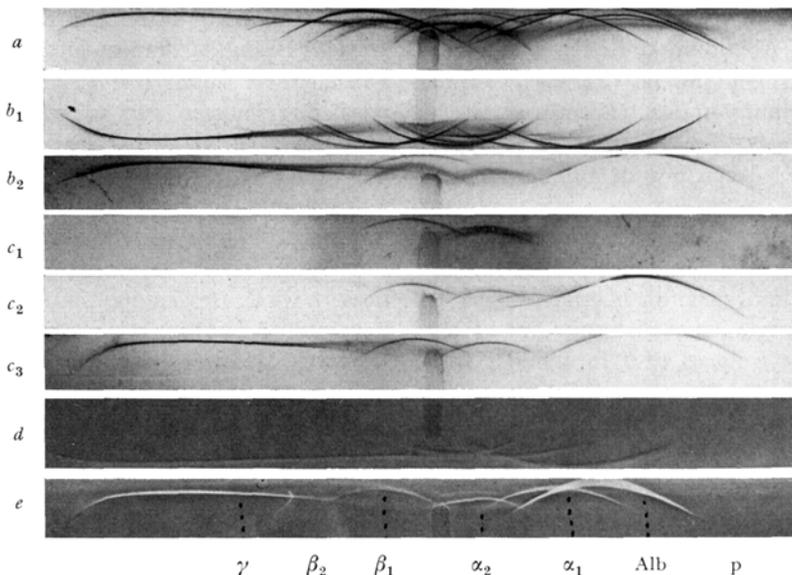


Abb. 7. Präzipitatlinien von Antisera *a* (Maulesel 282), *b*₁ (Pferd 31), *b*₂ (Pferd 1299), *c*₁ (Kaninchen 805), *c*₂ (Kaninchen 812), *c*₃ (Kaninchen 810), *d* (Huhn 2) und *e* (Ente 4) gegen normales Serum, human. Als Antigen jeweils in Agarelektrophorese aufgetrenntes normales Serum, human.

Polypeptid und eine dritte Linie der Kombination von beiden. Die obengenannten Immunsere präzipitierten nicht mit den freien synthetischen Polypeptiden, dagegen mit dem entsprechend gekuppelten Rinderalbumin; sie gaben ferner Kreuzreaktionen mit Serumalbumin (Mensch, Pferd, Rind), Ovalbumin und γ -Globulin (Mensch, Rind). Aus Dichte und Lage der Linien im Agar-Gel wurde die *antigene Wirksamkeit* in folgender Reihe *abnehmend* gefunden: Leucin > Phenylalanin > Glutaminsäure > Lysin. Die spezifische Präzipitation konnte weder durch die synthetischen Polypeptide noch durch die freien Aminosäuren gehemmt werden.

Um eine Plasmaproteinlösung zu erhalten, bei deren Transfusion die Übertragung von Hepatitis-Virus mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann, haben NITSCHMANN, KISTLER, RENFER, HÄSSIG und JOSS¹⁰⁶ einen neuen Weg beschritten. Durch die Totalentsalzung des Blutplasmas an einem Gemisch von Kationen- und Anionenaustauschharzen (I.R. 120, IRA 410 Rohm und Haas Co., Philadelphia, USA.) lassen sich das Fibrinogen und die thermolabilen Globuline abtrennen, der Rest an Plasmaprotein kann bei 60°C während 10 h pasteurisiert werden. Die Antigen-

III. *Über die Grenzen der Methode.* Die vorgenannten Beispiele von Anwendungen zeigen, was für ausgedehnte Messmöglichkeiten mit der Immunelektrophorese neu erschlossen werden. So möchte man glauben und wünschen, die Methode würde von einer grösseren Zahl von Forschungsstätten aufgenommen. Wenn bisher die einschlägigen Arbeiten überwiegend GRABAR und seinem Mitarbeiterkreis zu verdanken sind, dann muss die beschränkte Anwendung ihren Grund haben. So mag es in vielen Fällen nicht leicht sein, Antisera in der notwendigen Menge und von entsprechend hohem Titer zu beschaffen; die Gewinnung der Immunsere aus Grosstieren (Pferd, Rind) ist an einen langwierigen, kostspieligen Immunisierungsprozess gebunden. Entsprechend dem langsamern Globulinstoffwechsel dieser Tiere ist mit einer hohen Misserfolgsrate zu rechnen. Besonders erwähnenswert aber ist eine Schwierigkeit, welche allen immunchemischen Methoden anhaftet und deren breite Anwendung in vielen Fällen verunmöglichte. Es ist die von Tier zu Tier abweichende Bildung von Antikörper, welche die mit verschiedenen Immunsere erzielten Ergebnisse so schwer vergleichbar macht.

¹⁰⁷ Ausgeführt von J. J. SCHEIDEGGER.

¹⁰⁸ B. CINADER und J. H. PEARCE, Brit. J. exper. Path. 37, 541 (1956).

¹⁰⁶ H. NITSCHMANN, P. KISTLER, H. R. RENFER, A. HÄSSIG und A. JOSS, Vox sanguinis 1 [3] 183 (1956).

Als Beispiel mögen die Befunde von MUNOZ¹⁰⁹ dienen. Er immunisierte 18 Kaninchen in üblicher Weise mit kristallisiertem Serum-Albumin (Rind). Die Prüfung der Antisera gegen das zur Injektion verwendete Albuminpräparat ergab nach der Technik von OUDIN im Agar-Gel: 1 Tier ohne Präzipitatlinie, 12 Tiere mit 1 Linie, 2 Tiere mit 2 Linien und schliesslich 3 Tiere mit 3 Linien. Solche wesentlichen Unterschiede können mit Immunoelktrophorese gut sichtbar gemacht werden¹¹⁰. Auf Abbildung 7 finden sich Präzipitatlinien, wo als Antigen jeweils normales Serum, human, im Agar-Gel aufgetrennt war mit Antisera, die in Maulesel (*a*), Pferd (*b*₁, *b*₂), Kaninchen (*c*₁, *c*₂, *c*₃), Huhn (*d*) und Ente (*e*) gegen Serum human gebildet waren, reagierten.

Der Vergleich von *b*₁ mit *b*₂ oder von *c*₁, *c*₂ mit *c*₃ zeigt eindrücklich die von Tier zu Tier abweichende Linienbildung. Es mag damit zusammenhängen, dass in solchen Fällen im Tierorganismus nicht nur Antikörper gegen ein einzelnes heterologes Protein gebildet werden soll, sondern gleich gegen ein ganzes Spektrum der verschiedensten Fraktionen und Unterfraktionen. Dadurch werden offenbar an den Stellen der Proteingenesen Verdrängungen und Überschneidungen unvermeidlich. Es ist ebensowohl möglich, dass der Tierorganismus gegen die eine Proteinkomponente nur un-

genügend Antikörper bildet wie eine extra starke Bildung begünstigt. In beiden Fällen kann man nur über passend gewählte Konzentration bzw. Verdünnung des Antiserums zu jener Gleichgewichtskonzentration gelangen, welche eine analytisch optimale serologische Reaktion gewährleistet. Auf diese Weise muss in jedem Falle ein neues Immuneserum gewissenhaft ausgetestet werden. Eine gewisse Standardisierung der Resultate könnte erreicht werden, wenn die Testantigene als Bezugssubstanzen ausgetauscht würden. Diese Unsicherheit durch den «Tierfaktor» hat zur Folge, dass *Bestrebungen zur quantitativen Auswertung der Reaktion zurücktreten vor der Sicherstellung ihrer qualitativen Aussage.*

Nachdem die Immunoelktrophorese als Methode nur wenige Jahre besteht, darf erwartet werden, dass ihre Technik im Sinne einer Vereinfachung noch verbessert wird. Dessenungeachtet ist sie schon in ihren heutigen Ausführungsformen eine ausserordentlich wertvolle Methode zur serologischen Charakterisierung der verschiedensten Proteine und Proteide.

Summary

An account is given of Immuno-electrophoresis, as it originated from a combination of electrophoresis in agar-jelly and the various experiences with antigen/antibody reactions in gels. The theoretical background is detailed as well as different techniques. The increased sensitivity has gained us new insight into the composition of body fluids. Finally the limitations are discussed as they are proper to all the reactions which have an immuno-chemical basis.

¹⁰⁹ J. MUNOZ aus: *Serolog. Appr. to studies of protein structure and metab.* (Rutgers Univ. Press 1954), S. 55.

¹¹⁰ P. GRABAR, technische Mithilfe von Mlle J. COURCON (unveröffentlichte Ergebnisse).

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Antibiotics X-948 and X-1008

Two recent publications on Echinomycin¹ prompt us to publish the results of our investigation of two related antibiotics, X-948 and X-1008, of which the former is probably identical with Echinomycin. It yields the same degradation products (ammonia, quinoxaline-2-carboxylic acid, N-methyl-L-valine, L-alanine and D-serine) and resembles Echinomycin also in its physical properties².

¹ R. CORBAZ, L. ETTLINGER, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, F. KRADOLFER, L. NEIPP, V. PRELOG, P. REUSSER, and H. ZAHNER, *Helv. chim. Acta* 40, 199 (1957). - W. KELLER-SCHIERLEIN and V. PRELOG, *Helv. chim. Acta* 40, 205 (1957).

² Prof. V. PRELOG, to whom a sample of X-948 was sent, kindly compared the two antibiotics. He reported (personal communication) that they are very probably identical. He found that Echinomycin

Antibiotic X-948 was isolated from broth filtrates and cells of an apparently new *Streptomyces* species, our number X-948. This culture is possibly the same as *Streptomyces echinatus*¹, but there are at least two differences in the bacteriological characterization: *S. echinatus* does not grow on sodium citrate or liquefy gelatin, whereas *Streptomyces sp.* X-948 does both.

Antibiotic X-948 was also isolated from broths of *Streptomyces n. sp.* X-537 which produces a second crystalline antibiotic, designated as X-537A and described in 1951³. This streptomycete clearly differs from the

melted 8° lower than X-948, but that the mixed melting point showed no depression. The infrared absorption spectra were practically identical, with very small differences in the height of 3 weaker bands in the 8-8.5 μ region. Paper chromatography using the Bush C-system showed no differences.

³ J. BERGER, A. I. RACHLIN, W. E. SCOTT, L. H. STERNBACH, and M. W. GOLDBERG, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 5295 (1951).