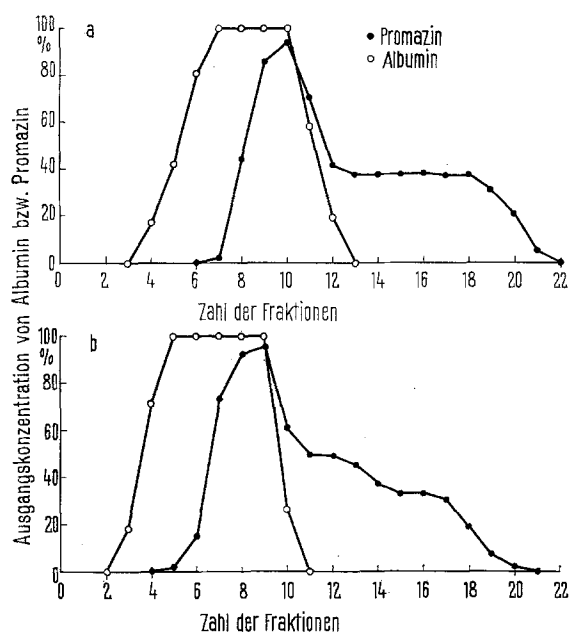


20 cm Höhe und 1,2 cm Durchmesser gebracht. Während der gesamten Versuchsdauer wurde Carbogen über die zu chromatographierende Lösung geleitet. Vor- und Nachelution wurden mit Carbogen äquilibrierter Krebs-Ringer-Lösung in der gleichen Weise vorgenommen. Der pH-Wert der Lösung blieb auf der so präparierten Säule konstant.

Zum Vergleich wurden bei Versuchen in Krebs-Ringer-Lösung unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die Säulen nicht mit Carbogen begast.

Ergebnisse und Diskussion. Bei Anwendung der Sephadex-Gelfiltration zur Bestimmung der Eiweißbindung kann im Gegensatz zur Ultrazentrifugation der pH-Wert



Gelfiltration einer bikarbonatgepufferten, promazinhaltigen 2%igen Rinderserumalbuminlösung. Abszisse: Zahl der Fraktionen (1 Fraktion = 3 ml). Ordinate: % der Ausgangskonzentration von Albumin bzw. Promazin. a) Beispiel einer Elutionskurve, die durch Überleiten von Carbogen über die zu untersuchende Lösung während der Gelfiltration gewonnen wurde. Die Plateauzone von Fraktion 13–18 entspricht der bei pH 7,4 vorliegenden freien Arzneimittelkonzentration. b) Beispiel einer Elutionskurve, die ohne Carbogenbegasung gewonnen wurde. In den Fraktionen 13–18 stellt sich kein Plateau ein.

einer mit Carbogen äquilibrierten und auf pH 7,4 eingestellten bikarbonatgepufferten Lösung konstant gehalten werden. Einfaches Überleiten von Carbogen über die zu chromatographierende Lösung verhindert ein Entweichen von CO_2 während der Gelfiltration. Die unter diesen Bedingungen in Bikarbonatpufferlösung gewonnenen Elutionskurven (Figur 1, a) zeigen ebenso wie die in Phosphatpufferlösung erhaltenen Kurven¹¹ ein Plateau (Fraktion 13–18 in Figur 1, a), das der bei pH 7,4 vorliegenden Konzentration an freiem Arzneimittel entspricht. Wird kein Carbogen über die zu chromatographierende bikarbonatgepufferte Lösung geleitet, so ändert sich während der Gelfiltration deren Wasserstoffionenkonzentration. Die so gewonnene Elutionskurve zeigt keine Plateauzone (Figur 1, b). Eine Bestimmung der Eiweißbindung ist unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Die in Bikarbonatpufferlösung unter Carbogenbegasung und in Phosphatpufferlösung gefundenen Werte stimmen gut überein. So wird in einer Bikarbonatpufferlösung, die 2 g/100 ml Albumin und $1,5 \times 10^{-4} M$ Promazin enthält, bei pH 7,4 und 37°C ein prozentualer Anteil an freier Substanz von $38,0\% \pm 0,7$ (angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n = 6$) bestimmt. In einer Phosphatpufferlösung ergibt sich unter den gleichen Bedingungen ein Wert von $36,2\% \pm 0,8$ (angegeben als $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n = 6$). Die Werte unterscheiden sich bei einem Vergleich mit dem t -Test nicht signifikant. Andererseits sind in verschiedenen Pufferlösungen geringe Unterschiede zu erwarten¹⁰. Konstante pH-Bedingungen können in prinzipiell gleicher Weise auch bei der Gleichgewichtsdialyse geschaffen werden⁶. Die Sephadex-Gelfiltration besitzt jedoch gegenüber der Dialysemethode den Vorteil einer relativ kurzen Bestimmungszeit⁶. Sterile Arbeitsbedingungen erscheinen deshalb nicht erforderlich.

Summary. A gel filtration method is described for quantitative estimation of protein binding of drugs at 37°C and pH 7.4 in solutions containing bicarbonate buffer.

E. JÄHNCHEN

Pharmakologisches Institut der Universität,
D-6500 Mainz (Deutschland), 8. April 1970.

¹⁰ W. SCHOLTAN, *Arzneimittel-Forsch.* 11, 707 (1961).

¹¹ J. KRIEGLSTEIN und G. KUSCHINSKY, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.* 262, 1 (1969).

Cinephotographic Superposition as a Technique for the Analysis of Sub-Cellular Movement

A given signal containing much random information in the form of 'noise', and non-random information in the shape of a constant signal that cannot instantaneously be differentiated from its background, can be discerned by the integration of the whole signal over a period of time. The random information then becomes self-cancelling, whereas that which is constant is additive, and is thus reinforced^{1,2}.

Similar considerations can be applied to microscopic as well as to other visual information, and random saltatory movements of sub-cellular particles should cancel out should it prove possible to integrate this information over a sufficient period of time.

Such a possibility is provided by the technique of time-lapse microcinematography, and this was therefore

tested using the cleaving eggs of the serpulid worm *Pomatoceros triqueter*.

Eggs and sperm were collected after removal of the worms from their hard limy tubes, and fertilization was achieved *in vitro*³. Cleaving eggs were then filmed by time-lapse using a Reichert Zetopan microscope with a Bolex H16 cinecamera. Time intervals were determined by a Prior timing unit and a locally devised shutter release.

¹ R. B. BLACKMAN and J. W. TUKEY, *Bell Syst. tech. J.* 37, 185, 485 (1958).

² D. M. A. MERCER, *Circadian Clocks* (North Holland Publishing Co., Amsterdam 1965).

³ J. B. CRAGG, *J. mar. biol. Ass. UK.* 23, 483 (1939).

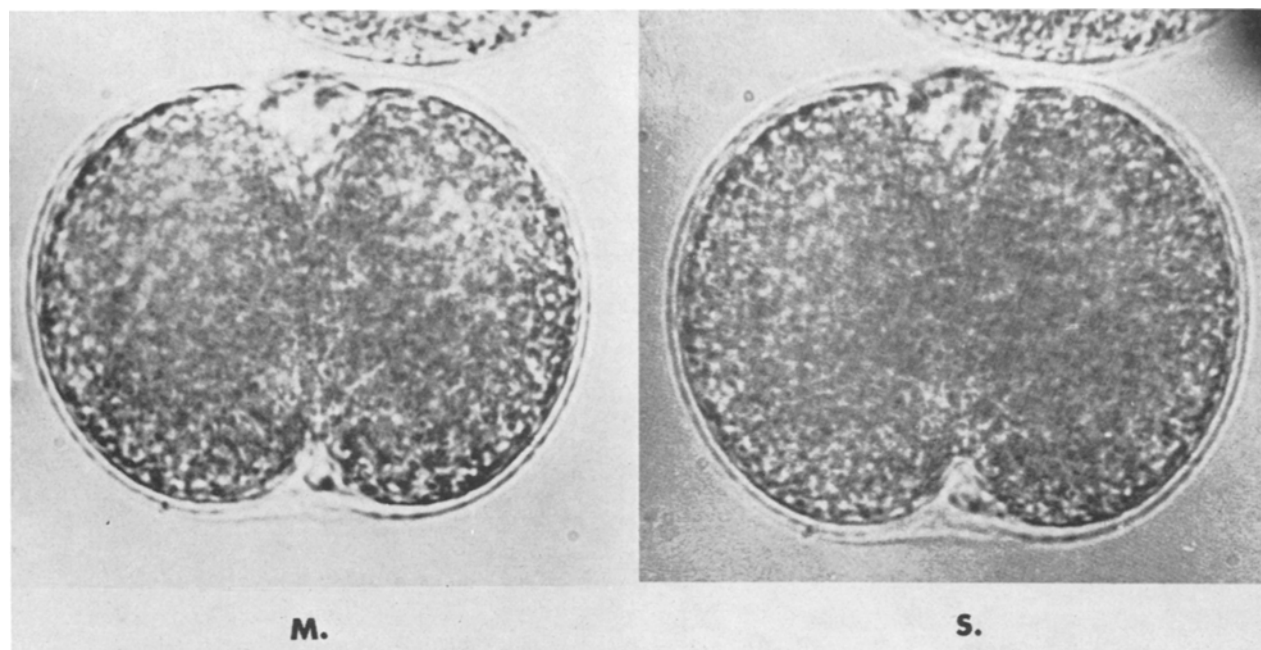


Fig. 1. Comparison of multiple exposures (M) and single shots (S) in the cleaving egg.

Films, with a time-lapse between frames of 1 sec, were made of the cleaving eggs, and as cleavage took about 13 min, approximately 780 frames were exposed for each cleavage. Sequential 1 sec exposures of the completed negative film at normal running speed (24 frames/sec) were projected on to Agfa rapidoprint FPS1 paper. To provide a standard of reference, single frame exposures from each of the 24 frame groupings were also made.

By comparison of multiple exposures (M) and single shots (S), it was obvious that non-random movement in the cleaving egg could readily be detected (Figure 1) by the extended streaks made by moving sub-cellular par-

ticles, whereas areas of random movement were blurred. Areas exhibiting these streaks were represented on a line diagram (Figure 2), which was prepared by close examination of large prints of the multiple exposures and comparing these with the single shots, the areas of supposed movement being drawn on the diagram. The technique, therefore, provides a useful means for detecting sub-cellular movements that are discernable with the naked eye but difficult to record and quantify.

It would seem that the method is potentially versatile and capable of application to a variety of problems involving cell movements. A more detailed analysis of movement in cleaving eggs will be published in due course⁴.

Zusammenfassung. Eine Methode zur einfachen Quantifizierung von gerichteten Bewegungen subzellularer Teile, zum Beispiel in Furchungszellen, wurde entwickelt.

I. AP GWYNN and P. C. T. JONES

Department of Zoology, University College of Wales, Aberystwyth (Wales, UK), 4 May 1970.

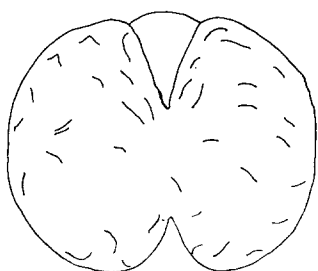


Fig. 2. Areas of supposed movement.

This work was financed by a grant from the Science Research Council.

Scanning Electron Microscopy of the Antigen-Antibody Complex

The Scanning Electron Microscope (SEM) has had limited use in microbiology. The instrument has been commercially available since 1965, and its application to studies of bacterial topography have been few¹⁻⁵. The purpose of this study was to examine, using SEM, the antigen-antibody complex formed on the surface of a bacterial cell.

Streptococcus mutans K-1R was used as the antigen. The organism was obtained from the National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. This oral streptococcus is of human origin, and has been shown to cause dental caries in experimental animals⁶. Antiserum to this organism was prepared in rabbits in our laboratory according to the method of KALONAROS and BAHN⁷. The K-1R