

186. Papierelektrophoretische Untersuchungen an Proteinen von *Mycobacterium Tuberculosis*

von E. Sorkin und J. M. Rhodes.

(2. VII. 56.)

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die antigene Struktur der Tuberkelbazillen zeigte es sich, dass ausser unseren analytisch-chemischen und serologischen Testverfahren¹⁾²⁾ auch physiko-chemische Identifizierungsmethoden für die isolierten Fraktionen erwünscht waren. In einer vorläufigen Mitteilung³⁾ beschrieben wir kürzlich die Anwendung der Papierelektrophorese für diesen Zweck. Die vorliegende Arbeit bringt einen ausführlichen Bericht über diese Experimente.

*Seibert, Pedersen & Tiselius*⁴⁾, *Watson*⁵⁾ und später zahlreiche andere Autoren benützten die freie Elektrophorese für ihre Antigenanalysen. Diese Methode ist jedoch etwas zeitraubend, teuer und verlangt beträchtliche Materialmengen, die oft nicht zur Verfügung stehen. Indessen ist diese Methode zuverlässig und ergibt zumeist scharfe Trennungen.

Unsere eigenen immunochemischen Untersuchungen¹⁾²⁾⁶⁾ und die Arbeiten anderer Autoren⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ haben bereits klargelegt, dass nicht erhitze Kulturfiltrate von virulenten Humanstämmen von Tuberkelbazillen mindestens fünf Proteine mit verschiedenen serologischen Spezifitäten, drei Polysaccharide sowie Desoxyribonukleinsäuren enthalten. Unsere papierelektrophoretischen Versuche, über die wir hier berichten, bestätigten die Kompliziertheit der antigenen Struktur von Tuberkelbazillen. Die Ergebnisse erlaubten auch, zusammen mit parallel geführten serologischen Testen die Homogenität der isolierten Antigenfraktionen zu überprüfen.

Experimenteller Teil.

1. Isolierung der in der Papierelektrophorese benützten Antigene. Der virulente Humanstamm E 9656 von *M. tuberculosis* (Kopenhagen) wurde in einem modifizierten *Sauton-Medium*¹⁾ 4 Wochen bei 37° kultiviert. Nach zwei *Seitz*-Filtrationen

¹⁾ *S. V. Boyden & E. Sorkin*, J. Immunol. **75**, 15 (1955).

²⁾ *E. Sorkin & S. V. Boyden*, J. Immunol. **75**, 22 (1955).

³⁾ *J. M. Rhodes & E. Sorkin*, *Experientia* **10**, 427 (1954).

⁴⁾ *F. B. Seibert, K. O. Pedersen & A. Tiselius*, J. exp. Med. **68**, 413 (1938).

⁵⁾ *D. W. Watson*, Thesis, Wisconsin 1941.

⁶⁾ *S. V. Boyden & E. Sorkin*, Ciba Foundation Symposium on Experimental Tuberculosis 1955, pp. 144--160, J. and A. Churchill, London.

⁷⁾ *F. B. Seibert*, Adv. Tuberc. Res. **3**, 1 (1950), S. Karger, Basel/New York.

⁸⁾ *F. B. Seibert, E. S. Figueroa & E. H. Dufour*, Amer. Rev. Tuberc. **58**, 363 (1955).

⁹⁾ *H. Platt*, Brit. J. exp. Path. **35**, 439 (1954).

¹⁰⁾ Für ein Übersichtsreferat siehe auch *S. V. Boyden & E. Sorkin*, Adv. Tuberc. Res. **7**, 17 (1956), S. Karger, Basel/New York.

und Konzentration durch Ultrafiltration von 40 l auf 200 ml erfolgte die Isolierung der Fraktionen. Sämtliche Vorgänge wurden zwischen 0° und 4° ausgeführt.

KK F = nicht erhitztes konzentriertes, gegen destilliertes Wasser dialysiertes und dann lyophilisiertes Kulturfiltrat.

Fraktion AC 1: 200 ml des konzentrierten, nicht erhitzten Kulturfiltrats (eine braune Flüssigkeit) werden mit 10-proz. Essigsäure auf pH 4,1 gebracht. Der voluminöse Niederschlag wird abzentrifugiert (2000 U./Min., International Refrig. Centrifuge) und der Bodenkörper nach Auflösen in 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung durch Zusatz des gleichen Volumens gesättigten Ammoniumsulfat bei pH 5,5 wieder ausgefällt. Der Niederschlag wird nach dem Zentrifugieren in wenig dest. Wasser suspendiert und 2 Tage gegen wiederholt ausgewechseltes dest. Wasser dialysiert und dann lyophilisiert. Diese Fraktion entspricht vermutlich *Seibert's C-Protein*¹¹⁾.

Fraktionen AL 481 und AL 483: Die nach Ausfällen mit Essigsäure und Zentrifugieren erhaltene überstehende Lösung wird mit 5-proz. Natriumcarbonatlösung neutralisiert (pH 6,5). Der Zusatz von einem gleichen Volumen 96-proz. Alkohol (bei – 15°) bewirkt eine Ausfällung. Der Niederschlag wird nach Zentrifugieren wieder in dest. Wasser aufgelöst und durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat bei pH 5,8 zum Teil wieder ausgefällt (AL 481). Die nach dem Zentrifugieren erhaltene überstehende Lösung wird mit Ammoniumsulfat gesättigt (AL 483). Beide Bodenkörper werden gegen dest. Wasser dialysiert und lyophilisiert. Das in gesättigtem Ammoniumsulfat lösliche Material wird ebenfalls dialysiert und lyophilisiert. Es enthält zur Hauptsache ein Polyglukosan, verwandt mit *Seibert's*¹¹⁾ Polysaccharid II.

Fraktionen AL 701, AL 702, AL 703: Die überstehende Lösung mit dem in 48-proz. Alkohol löslichen Material wird durch Zusatz von 96-proz. Alkohol von – 15° auf 70% Alkoholgehalt gebracht. Der abzentrifugierte Niederschlag wird in dest. Wasser gelöst und bei pH 5,8 mit dem gleichen Volumen gesättigtem Ammoniumsulfat versetzt. Der Niederschlag wird gelöst, dialysiert und lyophilisiert (AL 701).

Die überstehende Lösung wird mit Ammoniumsulfat gesättigt, der Niederschlag zentrifugiert, gelöst und wie üblich weiter behandelt (AL 702).

Das mit Ammoniumsulfat nicht ausfällbare Material wird dialysiert und lyophilisiert (AL 703). Es enthält fast ausschliesslich ein im *Middlebrook-Dubos* Test aktives Heteropolysaccharid (α -Hämosensitin)²⁾.

Fraktion AL 76 wird durch Behandeln des in 70-proz. Alkohol löslichen Materials mit mehr Alkohol erhalten. Das mit 76-proz. Alkohol ausfällbare Material wird umgefällt und nach Wiederauflösen und erneuter Fällung mit Ammoniumsulfat wie üblich aufgearbeitet (AL 76).

Fraktion Sup. 76: Die nach der Fraktionierung erhaltene alkoholische Mutterlauge wird dialysiert, durch Ultrafiltration konzentriert und lyophilisiert (Sub. 76).

Die so erhaltenen Antigenfraktionen sind typisch für die Produkte, die wir immer wieder aus nicht erhitzten Kulturfiltraten von *M. tuberculosis* (Humanstamm E 9656) isolieren konnten. Die Anfangskonzentration des angereicherten Kulturfiltrates an Proteinen und Polysacchariden wie auch die Ausbeuten schwankten jedoch erheblich (siehe Kapitel Reproduzierbarkeit).

PPD: Konzentriertes Kulturfiltrat von hitzegetöteten Kulturen virulenter Tuberkelbazillen (Humanstamm E₅M₂) wird mit 50-proz. Trichloressigsäure behandelt. Endkonzentration: 10% Trichloressigsäure. Nach einmaligem Umfällen wird mit Aceton und dann Äther bis zur Staubtrockene gewaschen.

Albumin (*Statens Seruminstitut*): Dieses als Vergleichspräparat in der Elektrophorese dienende Serumalbumin ist bovines Ursprungs.

Die Tabelle S. 1540 fasst die Darstellungsmethode der Antigenfraktionen und die Ergebnisse der chemischen Analyse zusammen (über die Methodik siehe auch *Boyden & Sorkin*¹⁾, *Rhodes*¹²⁾).

¹¹⁾ *F. B. Seibert*, Amer. Rev. Tuberc. **59**, 86 (1949).

¹²⁾ *J. M. Rhodes*, Thesis, London 1956.

Antigenfraktionen: Isolierung aus 40 l Kulturfiltrat; chemische Daten.

Antigen	Isoliert durch	Ausbeute mg	Protein ^c	Polysaccharide		Desoxyribo- nuklein- säure ^f
				Hexose ^d	Pentose ^e	
PPD h. ^{a)}	Fällung des erhitzten konz. Kulturfiltrats mit 50-proz. Tri- chloroessigsäure	—	61%	1%	3%	36%
KKF u. h. ^{b)}	Konzentrieren des nicht erhitzten Kulturfiltrates	—	42%	15%	13%	1%
AC 1 u. h.	Fällung mit 10-proz. Essigsäure bei pH 4,1	1754	98%	1%	—	0,4%
AL 481 u. h.	Fällung mit 48% Alkohol bei pH 6,5. Umgefällt bei pH 5,8 durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat	38	38%	0,6%	6%	0,6%
AL 483 u. h.	Fällung mit 48% Alkohol bei pH 6,5. Umgefällt bei pH 5,8 durch Vollsättigung mit Ammoniumsulfat	373	82%	—	—	—
AL 701 u. h.	Fällung mit 70% Alkohol bei pH 6,5. Umgefällt bei pH 5,8 durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat	14	42%	2%	5%	1%
AL 702 u. h.	Fällung mit 70% Alkohol. Umgefällt bei pH 5,8 durch Voll- sättigung mit Ammoniumsulfat	192	62%	3,5%	16%	1%
AL 76 u. h.	Fällung mit 76% Alkohol bei pH 6,5	110	44%	10%	28%	3%
Sup. 76 u. h.	Lyophilisation der Lösung in 76-proz. Alkohol nach Dialyse und Konz. durch Ultrafiltration	133	82%	6%	2%	0,6%

a) h. = aus hitzgetöteten Kulturen.

b) u. h. = aus nicht erhitzten Kulturen.

c) W. Q. Wolfson, C. Cohen, E. Calvary & F. Ichiba, Amer. J. clin. chim. Pathol. **18**, 723 (1948).d) D. L. Morris, Science **107**, 254 (1948).e) Z. Dische, J. biol. Chemistry **181**, 379 (1949).

f) Siehe E. A. Kabat & M. M. Mayer, Experimental Immunochimistry, S. 321, C. C. Thomas, Illinois (1954).

Papierelektrophoretische Methodik. Es wurde das horizontale Verfahren angewendet in einer Apparatur, die der von *Grassmann & Hannig* beschriebenen¹³⁾ glich, die aber Raum bot für bis zu 10 Streifen, mit Elektrodengefäßen nach *Kunkel & Tiselius*¹⁴⁾. Die Streifen wurden freihängend über Perspexbrücken gelegt. Diese Methode ergab bessere Auftrennungen als die Plattenmethode, die wir in unserer vorläufigen Mitteilung³⁾ beschrieben. Papierstreifen von 44 cm × 4 cm (Papier: *Munktel* 20, 150 g¹⁵⁾) wurden mit Veronalpuffer, pH = 8,6, $\mu = 0,1$, befeuchtet und über die Brücken gelegt, wobei die Enden in den Puffer eintauchen. Nach Einstellung des Gleichgewichtes durch 2stündiges Stehenlassen bei +4° werden die Antigene als kreisförmige Flecken 4 cm von der Brückenaufgabe entfernt auf das Papier aufgetragen. Es wurden 0,02 ml von 5—10-proz. Lösungen der Fraktionen im Veronalpuffer verwendet. Als Vergleichspräparat diente 0,02 ml einer 5-proz. Lösung von bov. Serumalbumin. Elektrophorese mit 16—20 mAmp und 200 V, 19 Std. bei +4°.

Anfärben der Proteinzonen nach der von *Durrum*¹⁶⁾ beschriebenen Bromphenolblau-Methode. Man läßt eine 1-proz. Bromphenolblaulösung in mit HgCl₂ gesätt. Alkohol 20 Min. auf die Streifen einwirken. Der überschüssige Farbstoff wird hierauf mit 0,5-proz. Essigsäure herausgewaschen.

Die Färbemethode mit Amidoschwarz 10 B nach *Grassmann & Hannig*¹³⁾ wurde zum Vergleich mit Bromphenolblau herangezogen, um ihre Eignung für Tuberkuloproteine festzulegen.

Fraktion Sup. 76 wurde als Testantigen benützt. Nach der Elektrophorese wurden die angefärbten Streifen im Elphorphotometer gemessen. Der mit Bromphenolblau gefärbte Streifen wurde dann mit 0,01-n. NaOH bei Zimmertemperatur eluiert. Unter diesen Bedingungen konnten die mit Amidoschwarz angefärbten Zonen nicht eluiert werden. Wie Fig. 1 zeigt, findet mit Amidoschwarz mehr unspezifische Adsorption an das Papier statt, was möglicherweise mit Mängeln unserer Technik, mit ungenügendem Waschen oder mit der Natur der verwendeten Tuberkuloproteine zusammenhängt. Es fand daher allein die Bromphenolblau-Methode Verwendung.

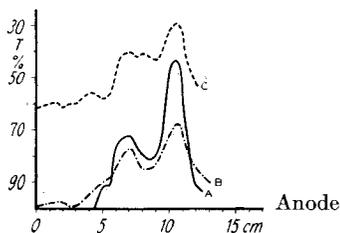


Fig. 1.

Vergleich der Anfärbungsmethoden für ein papierelektrophoretisch getrenntes Gemisch von Tuberkuloproteinen (Sup. 76). Bedingungen: siehe unter Methodik.

Kurve A = Bromphenolblauanfärbung, eluiert mit 0,01-n. NaOH und im *Beckman*-Spektrophotometer gemessen.

Kurve B = Bromphenolblauanfärbung. Direkte Ablesung im Elphorphotometer.

Kurve C = Amidoschwarzanfärbung. Direkte Ablesung im Elphorphotometer.

Die Ordinaten-Werte gelten nur für Kurve A. Die Werte der Kurven B und C fallen in den gleichen Bereich.

¹³⁾ *W. Grassmann & K. Hannig, Z. physiol. Chem.* **290**, 1 (1952).

¹⁴⁾ *H. G. Kunkel & A. Tiselius, J. Gen. Physiol.* **35**, 89 (1951).

¹⁵⁾ Bezogen von *Grycksbo Pappersbruk Aktiebolag*, Grycksbo (Schweden).

¹⁶⁾ *E. L. Durrum, J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2943 (1950).

Anfärben der Polysaccharide mit Hilfe der Perjodsäure-Schiff-Reaktion. Wir folgten den Angaben von *Köiw & Grönwall*¹⁷⁾ mit Ausnahme der Färbezeit; 10–20 Min. genügte zur Entwicklung, längeres Anfärben gab stark gefärbte Papierstreifen.

Quantitative Auswertung: Zur Messung der von den aufgetrennten Proteinen aufgenommenen Farbstoffmenge wurden die Papierstreifen in Segmente von 0,5 cm zerschnitten, diese mit je 2 ml 0–0,1-n. NaOH eluiert und die Farbkonzentration der Eluate bei 595 m μ im *Beckman*-Spektrophotometer gemessen. Die so erhaltenen Kurven werden weiter unten diskutiert.

Resultate.

Fig. 2 stellt eine photographische Wiedergabe der papierelektrophoretisch untersuchten und mit Bromphenolblau angefärbten Tuberkuloantigene (siehe Tabelle I) dar. Es ist bereits hier deutlich, dass keine der isolierten Proteinfraktionen homogen ist.

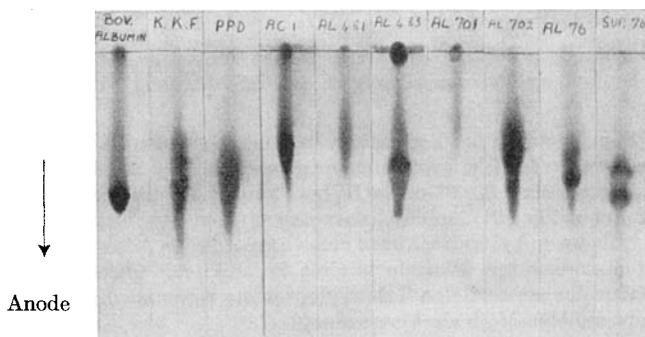


Fig. 2.

Filtrierpapierelektrophorese von PPD, von konz. Kulturfiltrat (KKF) und den in Tab. I beschriebenen Tuberkuloproteinfraktionen. 20 μ l einer 10-proz. Lösung jeder Fraktion in Veronalpuffer, pH = 8,6, μ = 0,1 wurden angewendet. Bedingungen: 19 Std.; +4°; 22 mAmp.; 220 V; Bromphenolblauanfärbung.

Eine detaillierte Analyse der Fraktionen erhielten wir durch die quantitative Auswertung nach der Elution der Streifen. Die Kurven in Fig. 3–11 zeigen die Ergebnisse der Messungen.

Fig. 3 zeigt deutlich die Kompliziertheit des nicht erhitzten konzentrierten Kulturfiltrates (KKF) und auch die grosse Verschiedenheit in der Zusammensetzung von PPD, dem Trichloressigsäure-Niederschlag von erhitzten Kulturfiltraten. Offensichtlich variieren die Antigenfraktionen erheblich in ihrer Zusammensetzung, wie z. B. Vergleiche von AL 701 und Sup. 76 oder AC 1 und AL 76 zeigen.

Einige der Fraktionen zeigen Protein zonen mit ähnlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, was vermuten lässt, dass möglicherweise Proteine mit ähnlichem serologischem Verhalten vorliegen. Entsprechende serologische Versuche (Kreuzreaktionen) haben wiederholt

¹⁷⁾ *E. Köiw & A. Grönwall*, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **4**, 245 (1952).

gezeigt, dass auch tatsächlich Proteine mit ähnlichen Spezifitäten in verschiedenen Fraktionen zugegen waren¹⁸⁾.

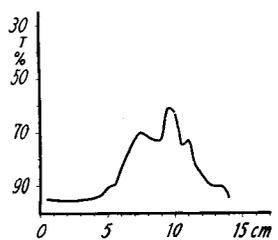


Fig. 3.

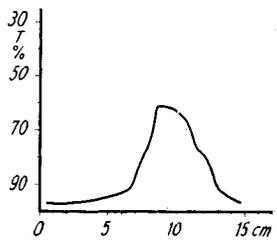


Fig. 4.

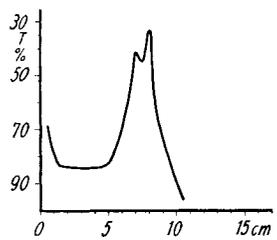
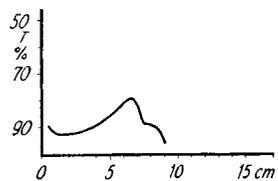
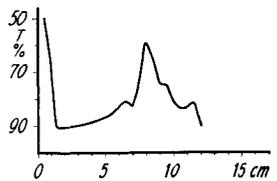


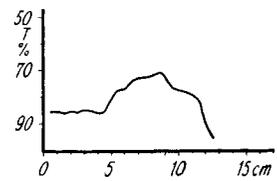
Fig. 5.



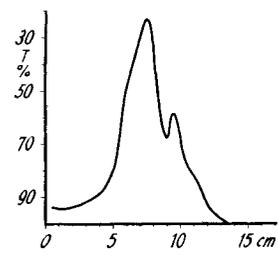
AL 481 Fig. 6.



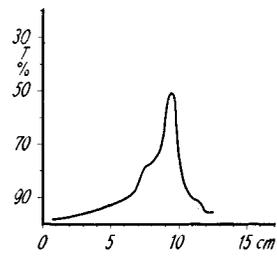
AL 483 Fig. 7.



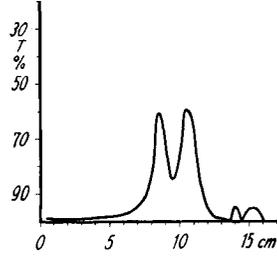
AL 701 Fig. 8.



AL 702 Fig. 9.



AL 76 Fig. 10.



Sup. 76 Fig. 11.

Fig. 3—11.

Quantitative Auswertung papierelektrophoretisch getrennter Tuberkuloproteine. Die in Fig. 2 gezeigten Papierstreifen wurden in Segmente von 0,5 cm zerschnitten, mit 0,01-n. NaOH eluiert und bei 595 m μ gemessen.

Schwanzbildung: Einige Fraktionen wiesen bedeutende Schwanzbildung auf. Es war daher von Interesse festzustellen, ob diese Effekte durch die angewendete Technik bedingt sind, wie etwa durch Schwerlöslichkeit der Antigene, zu starke Adsorption der Proteine an das Papier, oder durch die Unreinheit der Präparate. Im Falle des leicht löslichen Sup. 76 beobachteten wir nie Schwanzbildung, hingegen zeigten die schwerer löslichen Fraktionen AC 1, AL 483, und AL 702 stets starke Schwanzbildung. Es ist möglich, dass im Verlaufe der Fraktionierung eine gewisse Denaturierung dieser Proteinpräparate eintrat.

¹⁸⁾ S. V. Boyden, unveröffentlichte Versuche.

Wie jedoch in der nachfolgenden Arbeit¹⁹⁾ gezeigt wird, können gewisse Fraktionen durch Elektrophorese in Stärke soweit gereinigt werden, dass bei der Papierelektrophorese die meisten Zonen ohne Schwanzbildung erhalten werden. Dies weist darauf hin, dass zumindest in einigen Fraktionen die Schwanzbildung durch andere Proteinstoffe verursacht ist²⁰⁾.

Bei Versuchen zur Ausschaltung des Faktors „Adsorption“ folgten wir Hinweisen von *Tiselius & Flodin*²¹⁾. Zahlreiche oberflächenaktive Stoffe wurden zwecks Verminderung der Schwanzbildung untersucht (z. B. Cetylsulfonat, Natriumcaprylat, Dodecylsulfat, Span 20, Tween 80). Nur mit Tween 80 zeigte sich eine Andeutung von Verbesserung des Elektrophoresebildes. Vorgängiges Eintauchen des Papierstreifens in verdünnte Proteinlösungen, um die Zentren der Adsorption zu blockieren, ergab keinerlei Änderung der Resultate.

Reproduzierbarkeit der Fraktionen. Zusammen mit dem serologischen Austesten bot die papierelektrophoretische Analyse einen guten Hinweis für die Reproduzierbarkeit der Trennung der Fraktionen. Die meisten der in Tabelle 1 beschriebenen Antigene konnten in über 25 ähnlichen Fraktionierungsprozessen wiedergefunden werden. Die Verteilung der Zonen in der Papierelektrophorese war stets ähnlich, wenn auch nie identisch. Die Schärfe der Trennungen der einzelnen Zonen wechselte von Fraktionierung zu Fraktionierung. Die Proteinkonzentration bei gleicher Wanderungsgeschwindigkeit änderte sich ebenfalls, wie direkte Proteinbestimmungen zeigten. Die Ursachen derartiger Variabilitäten sind vermutlich zum Teil in Veränderungen des Antigenspektrums, des Bakterienstammes, der Wachstumscharakteristik und der Fraktionierungsmethodik zu suchen. Des weiteren birgt auch die papierelektrophoretische Technik gewisse Fehlerquellen in sich. Wird die gleiche Fraktion auf 5 Streifen in einem Parallelversuch verteilt, so werden immerhin fast identische Zonenbilder erzielt (Fig. 12).

Kam der gleiche Versuch mit neuen Papierstreifen unter sonst gleichen experimentellen Bedingungen zur Wiederholung, so wurden wohl ähnliche Zonentrennungen erhalten, aber die Wanderungsgeschwindigkeiten wichen von denjenigen des vorherigen Versuchs ab. Der Gebrauch von nicht identischen Papierstreifen, dann Elektrose und Verdampfung des Lösungsmittels sind nur einige der Variablen, die die Reproduzierbarkeit ungünstig beeinflussen.

Die Anwendung von Albumin als Vergleichspräparat ermöglichte es daher, die Resultate verschiedener Experimente zu vergleichen.

¹⁹⁾ *E. Sorkin, J. M. Rhodes & S. V. Boyden, Helv. 39, 1547 (1956).*

²⁰⁾ *H. G. Kunkel & A. Tiselius, J. Gen. Physiol. 35, 89 (1951).*

²¹⁾ *A. Tiselius & P. Flodin, Adv. Protein Chemistry 8, 461 (1953).*

Papierelektrophoretische Trennung von Proteinen und Polysacchariden. Die oben wiedergegebene Methode kann auch für Trennungen von Proteinen und Polysacchariden in Antigenpräparaten benutzt werden.

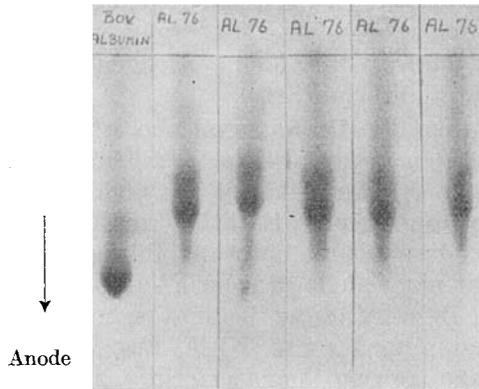


Fig. 12.

Reproduzierbarkeit der papierelektrophoretischen Trennung von Tuberkuloproteinen, Fraktion AL 76.

Die Elektrophorese führten wir bei 16–20 mAmp, 220 V, 19 Stunden bei +4° aus. Nach Anfärben des Streifen für Protein beziehungsweise für Polysaccharide ergab sich eine deutliche Trennung der Protein- von den Polysaccharidzonen (Fig. 13).



Fig. 13.

Papierelektrophoretische Trennung von Tuberkulopolysacchariden und -proteinen. Polysaccharid-Nachweis: mit Perjodsäure-Schiff-Reaktion. Protein-Nachweis: Bromphenolblaufärbung. Angewendet 0,02 ml einer 10-proz. Lösung von KKF.

Diskussion.

Wie in andern Fällen²¹⁾²²⁾ erwies sich auch in unseren Untersuchungen das papierelektrophoretische Verfahren als wertvolles Hilfsmittel zur Kontrolle der Homogenität von Tuberkuloproteinen und Polysaccharidfraktionen aus Kulturfiltraten des *M. tuberculosis*. Die Methode hat der klassischen Elektrophorese von *Tiselius* gegenüber den Vorteil, dass sie nur kleine Antigenmengen benötigt und dass sie einfach zu handhaben ist.

Die Auftrennung der Proteingemische ist nicht immer befriedigend, speziell bei den wenig löslichen Fraktionen. Dies ist vermutlich zum Teil in der Schwanzbildung des nicht scharf abgetrennten AC 1 Proteins begründet. Diese Fraktion zeigte konstant starke Adsorption durch das Papier und Schwanzbildung. Aus den bisherigen 330 Versuchen geht noch nicht ganz klar hervor, ob Schwanzbildung nicht auch durch Denaturierung bedingt sein kann. Die Tatsache, dass etwa das Originalkonzentrat (KKF) fast keine Schwanzbildung zeigt, lässt auf eine gewisse Denaturierung zumindest bei einigen Fraktionen im Verlaufe der Fraktionierung schliessen. Ferner zeigten Versuche mit schwanzbildenden Fraktionen, die in Stärke und Glas fraktioniert wurden (siehe folgende Arbeit), dass Stoffe mit höherem Reinheitsgrad fast keine Schwanzbildung mehr, sondern scharfe Zonen aufweisen.

Wie sich feststellen liess, haben die Zahl der angewendeten Papierstreifen, ihr Abstand und die Antigenmenge einen gewissen Einfluss auf die Ergebnisse. Versuche, bessere Resultate mit punktförmigen Auflagen für das Papier statt mit freihängender Lage über Brücken zu erzielen, verliefen ergebnislos.

In Verbindung mit serologischen Verfahren dürfte die geschilderte Methode von einigem Wert für die zukünftige Arbeit mit Tuberkuloseantigenen sein.

SUMMARY.

A filter paper electrophoretic procedure is described for the separation of tuberculo-proteins. The method could also be applied to the separation of polysaccharide and protein mixtures.

Tuberculosis Immunization Research Centre,
c/o Statens Seruminstitut,
Kopenhagen, Dänemark.

²²⁾ *H. G. Kunkel*, *Methods of Biochemical Analysis* 1, 141 (1954), Interscience Publ., New York.