

## 187. Präparative zonenelektrophoretische Trennung von Tuberkuloproteinen mit Hilfe einer Zonentransfertechnik

von E. Sorkin, J. M. Rhodes und S. V. Boyden.

(2. VII. 56.)

In einer Reihe von Beiträgen zum Studium der Antigene der Tuberkelbazillen berichteten wir kürzlich über die serologische Differenzierung<sup>1-3)</sup> und die papierelektrophoretische Trennung<sup>4)</sup> von antigenen Protein- und Polysaccharid-Gemischen. In der vorhergehenden Mitteilung<sup>5)</sup> gaben wir eine detaillierte Schilderung unserer Papier-elektrophoreseversuche. Da eine Reihe von Fraktionierungsverfahren nur zu einer partiellen Auftrennung der komplexen Proteingemische führte<sup>1)5)</sup>, sahen wir uns veranlasst, die Möglichkeit einer Trennung der Tuberkuloproteine mit Hilfe der präparativen Zonenelektrophorese<sup>6)</sup> zu untersuchen.

Diese Methode hat seit kurzem Anwendung für Proteintrennungen gefunden. So wurde Stärke als Trägersubstanz für das Studium von Serumkomponenten<sup>7)</sup>, Oxytocin und Vasopressin<sup>8)</sup>, Phosphatase<sup>9)</sup>, Silicagel für Insulinabbauprodukte<sup>10)</sup> und Agargel für Serum<sup>11)</sup> benützt. Glaspulver wurde von *Allfrey* und Mitarb.<sup>12)</sup> zur Analyse von Mäuseleber angewendet.

In der vorliegenden Untersuchung kamen Stärke (Kartoffel), zwei Typen von Zellulosepulver (*Whatman* und *Solka-Floc*), Glaspulver verschiedener Qualität (Pyrex, Jena, Topz ballotini), Ionenaustauscher Dowex 1-X8 und Mischbetaustauscher JR 4B-JRC 50 (1:1) für die Trennung von Tuberkuloproteine zur Anwendung. Es zeigte sich bald, dass Stärke die besten Trennergebnisse aufwies. Nachteile waren jedoch die grossen Proteinverluste und weiterhin die Elution von relativ grossen Mengen Stärke zusammen mit den Proteinen. Auf der andern Seite ergaben Versuche in Glas (Topz ballotini) die beste

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

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

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

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

5) *E. Sorkin & J. M. Rhodes*, *Helv.* **39**, 1538 (1956).

6) Für Übersichtsreferate siehe *A. Tiselius & P. Flodin*, *Adv. Protein Chemistry* **8**, 461 (1953); *H. G. Kunkel* in *Methods of Biochemical Analysis* **1**, 141 (1954).

7) *H. G. Kunkel & R. J. Slater*, *J. clin. Invest.* **31**, 677 (1952).

8) *S. P. Taylor, V. du Vigneaud & H. G. Kunkel*, *J. biol. Chemistry* **205**, 45 (1953).

9) *E. Harris & J. W. Mehl*, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* **90**, 521 (1955).

10) *F. Sanger & H. Tuppy*, *Biochem. J.* **49**, 463 (1951).

11) *A. H. Gordon, B. Keil, K. Sebesta, O. Knessl & F. Sorm*, *Coll. Trav. chim. Tchécosl.* **15**, 1 (1950).

12) *V. Allfrey, M. Daly & A. E. Mirsky*, *J. gen. Physiol.* **37**, 157 (1953).

Rückgewinnung der Antigene. Es wurde deshalb eine Transferierung der in Stärke getrennten und durch Papierabdruck lokalisierten Protein-zonen in einem Glasblock mit anschliessender zweiter Elektrophorese benützt. Die Protein-zonen in Glas wurden wiederum durch Papierabdruck lokalisiert, eluiert, dialysiert und lyophilisiert. Bessere Ausbeuten und stärkefreie Proteine konnten auf diese Weise erhalten werden.

Die Homogenität der Präparate wurde papierelektrophoretisch und serologisch überprüft. Es zeigte sich, dass sich aus einem komplexen Proteingemisch zumindest 3 Antigene mit vollständig verschiedenen Spezifitäten auftrennen liessen. Andere Präparate wurden ebenfalls erfolgreich mit dem gleichen Verfahren in ihre Proteinkomponenten zerlegt.

Die Totalausbeute an isolierten Komponenten ist noch unbefriedigend, was vermutlich durch irreversible Adsorption und Denaturierung in der Stärke während der Elektrophorese bedingt ist.

#### Materialien und Methodik.

Pufferlösung: Natriumveronal-Veronalpuffer, pH = 8,6,  $\mu = 0,1$ .

Trägersubstanzen: *Kartoffelstärke*<sup>13)</sup> wird auf einem *Buchner*-Trichter mit grossen Quantitäten destilliertem Wasser solange gewaschen, bis das Filtrat proteinfrei abläuft. Die Stärke wird dann mit obigem Veronalpuffer gewaschen, in Veronalpuffer suspendiert, von grobkörnigen Teilchen und Verunreinigungen befreit, filtriert, mit dest. Wasser gewaschen und bei 50° getrocknet.

*Glaskörner*: Topz ballotini, Durchmesser 0,1 mm<sup>14)</sup>.

*Jenaer neutral Glaskörner*<sup>15)</sup>.

*Pyrex-Glaspulver*<sup>16)</sup>.

*Zellulosepulver*: Whatman für Chromatographie<sup>17)</sup>.

*Zellulosepulver*: Solka-Floc BW 200<sup>18)</sup>.

*Anionenaustauscher Dowex 1-XA*  $\times 8$  feinpulvrig<sup>19)</sup>.

*Mischbett-Ionenaustauscher* aus Amberlite JR 4B und JRC 50 (1:1)<sup>20)</sup>.

*Antigene*: 3 Tuberkulofractionen wurden im Verlaufe dieser Arbeit benützt. Sie entsprechen den in der vorhergehenden Arbeit beschriebenen Fraktionen AL 702, AL 76 und Sup. 76<sup>5)</sup>.

Papierelektrophoretische Methodik: in der vorhergehenden Arbeit beschrieben<sup>5)</sup>.

Apparatur: Es wurde eine rechteckige Form aus Perspex ähnlich der von *Tiselius & Flodin*<sup>6)</sup> beschriebenen benützt. Die Dimensionen waren zumeist wie folgt: Querschnitt 11 mm  $\times$  33 mm, Länge 250 mm. Während des Versuches wird die Form mit einem Perspex-Deckel versehen. Die zwei schmalen Seiten der Form haben kleine Öffnungen, durch die ein Stück Filtrierpapier durchgezogen wird. Dieses wird innerhalb der Form

<sup>13)</sup> Bezogen von *Hopkins & Williams*, Chadwell Heath, Essex, England.

<sup>14)</sup> Bezogen von *English Glass Company*, Leicester, England.

<sup>15)</sup> Bezogen von *Schott & Gen.*, Mainz, Deutschland.

<sup>16)</sup> Bezogen von *J. A. Jobling & Co. Ltd.*, Wear Glass-Works, Sunderland, England.

<sup>17)</sup> Bezogen von *W. R. Balston Ltd.*, Springfield, Maidstone, England.

<sup>18)</sup> Bezogen von *Brown Company*, Boston 14, Mass., USA.

<sup>19)</sup> Bezogen von *The Dow Chemical Company*, Midland, Mich., USA.

<sup>20)</sup> Ungemischt bezogen von *British Drug Houses Ltd.*, Poole, England.

aufgerollt, um guten Kontakt mit der Trägersubstanz zu sichern; ausserhalb dagegen hängt das Papier frei in die Pufferlösung der Elektrodengefässe vom Typus, den *Kunkel & Tiselius*<sup>21)</sup> beschrieben haben.

Vorbereitung von Träger und Protein zur Elektrophorese. Die Trägersubstanzen werden mit dem Veronalpuffer in den in Tabelle 1 angegebenen Mischungsverhältnissen angeteigt. Die Paste wird in die Perspexform gegossen. Überschüssige Feuchtigkeit wird mit Filtrierpapier abgepresst, bis der Block fest, aber noch feucht ist. Die gefüllte Form wird auf die Kanten der Elektrodengefässe aufgelegt und zur Einstellung des Gleichgewichts mit den Pufferlösungen 2–3 Std. bei +4° sich selbst überlassen.

Die Proteingemische werden im gleichen Puffer gelöst (5–10-proz. Lösungen), mit wenig Träger gemischt und dann, da sie negativ geladen sind, 1–2 cm vom Kathodenende des Blockes an Stelle eines ausgeschnittenen Trägersegmentes (1 cm × 2,5 cm × 0,8 cm) eingebettet. Ein Stück Filtrierpapier wird unter dem Perspexdeckel zur Verhinderung des Abtropfens von Kondenswasser angebracht, dann wird der Deckel verschraubt und die Form auf die Elektrodenzellen gesetzt.

Elektrophorese-Bedingungen: Die meisten Versuche wurden bei 300–400 Volt, 17 mAmp und +4° ausgeführt. Die Dauer schwankte zwischen 20 und 45 Std. Längere Laufzeiten gaben keine verbesserten Resultate.

Lokalisierung und Elution der Zonen und Bewertung der Trennung. Zur Lokalisierung der Protein zonen nach der Elektrophorese wird für einige Sek. ein schmaler Filtrierpapierstreifen entlang dem Zentrum des Blockes aufgelegt (*Consdon* und *Mitarb.*<sup>22)</sup>), dieser mit Bromphenolblau angefärbt und mit 0,05-n. Essigsäure gewaschen. Der Streifen wird dann in Segmente von 0,5 cm oder 1 cm zerschnitten, diese werden mit 0,01-n. Natriumhydroxyd eluiert, und die Farbintensität wird photometrisch bei 595 m $\mu$  im *Beckman*-Spektrophotometer Model DU gemessen. Die Ablesungen (% Transmission) werden gegen den Abstand vom Startpunkt aufgetragen.

Zur direkten Lokalisation der Zonen im Block wurde dieser in 1-cm-Segmente geteilt und diese mit je 5 ml 0,01-n. NaOH im Reagensglas eluiert. 2 ml der überstehenden Lösung wurden mit dem *Folin-Ciocalteu*-Reagens quantitativ bei 660 m $\mu$  gemessen. Für präparative Zwecke wurden die Segmente mit 0,9-proz. NaCl-Lösung extrahiert, die Eluate gegen dest. Wasser dialysiert und lyophilisiert.

## Resultate.

Zur Bewertung der Trenneffekte in verschiedenen Trägern wurden zunächst in einer Reihe von Versuchen (s. Tabelle 1 und Fig. 1–5) je 10 mg eines Proteingemisches („Sup. 76“), welches in der Papierelektrophorese zwei klar definierte Zonen zeigte<sup>5)</sup>, in verschiedenen Trägersubstanzen getrennt.

Aus Tabelle 1 und Fig. 1–5 geht hervor, dass die besten Auftrennungen mit Stärke erhalten werden. Andere Trägersubstanzen, wie etwa Zellulosepulver und Glaspulver (*Topz ballotini*) gaben eine gewisse Trennung, die aber ungenügend war, um ihre weitere Anwendung zu rechtfertigen. Einige Träger, wie etwa Jena-Glaspulver gaben keine oder nur unvollständige Trennungen, und von anderen Trägern konnte weder ein Papierabdruck gemacht noch eine Elution der Proteine verwirklicht werden. Die guten Trenneffekte mit Stärke dagegen waren stets reproduzierbar.

<sup>21)</sup> *H. G. Kunkel & A. Tiselius*, *J. Gen. Physiol.* **35**, 89 (1951).

<sup>22)</sup> *R. Consdon, A. H. Gordon & A. J. P. Martin*, *Biochem. J.* **40**, 33 (1946).

Tabelle 1.

Grad der zonenelektrophoretischen Trennung von Tuberkuloproteingemisch (Sup. 76) in verschiedenen Trägersubstanzen.

360 V, 17—20 mA, + 4°, Veronalpuffer, pH = 8,6,  $\mu = 0,1$ .

Trägersubstanz	Gramm Trägersubstanz in ml Puffer	Versuchsdauer in Stunden	Grad der Auftrennung
Zellulosepulver Solka-Floc . .	20 g/70 ml	30	gering
Zellulosepulver <i>Whatman</i> . .	20 g/40 ml	30	mässig
Mischbett-Ionenaustauscher JR 4B-JRC 50 (1:1) . . . . .	30 g/15 ml	30	nicht eluierbar mit 2-n. NaOH
Anionenaustauscher Dowex 1-X8 . . . . .	50 g/27 ml	20	nicht eluierbar mit 2-n. NaOH
Stärke . . . . .	70 g/60 ml	30	gut
Pyrex-Glaspulver . . . . .	110 g/50 ml	20	nicht eluierbar mit 2-n. NaOH
Jena neutral Glaspulver . .	44 g/20 ml	20	keine Trennung
Glaspulver Topz ballotini . .	160 g/55 ml	30	teilweise Trennung

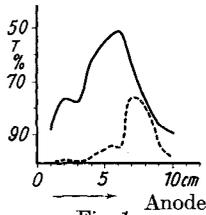


Fig. 1.  
Solka-Floc-Zellulosepulver.

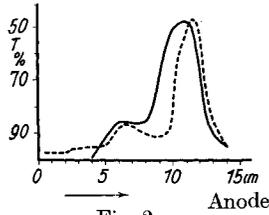


Fig. 2.  
*Whatman*-Zellulosepulver.

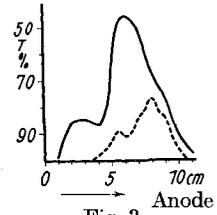


Fig. 3.  
Glaspulver (Topz ballotini).

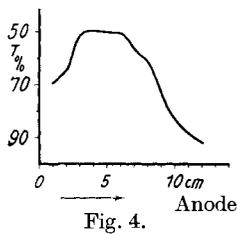


Fig. 4.  
Glaspulver (Jena).

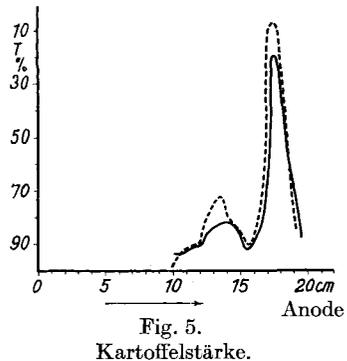


Fig. 5.  
Kartoffelstärke.

Fig. 1—5.

Ergebnis der zonenelektrophoretischen Trennungsvorversuche von Tuberkuloprotein („Sup. 76“) in verschiedenen Trägern. Bedingungen: siehe Tabelle 1 und Text.

- Jeder Block wurde in 1-cm-Segmente geteilt, mit 0,01-n. NaOH eluiert und das Protein mit dem *Folin-Ciocalteu*-Reagens bei 660  $m\mu$  bestimmt.
- - - - - Abdruck mit Filtrierpapierstreifen, Anfärben des Streifens mit Bromphenolblau und Elution mit 0,01-n. NaOH. Messung bei 595  $m\mu$ .

Für die weiteren Studien war es erwünscht, festzustellen, ob nach der Elektrophorese der Papierabdruck die wahre Lage der Protein-zonen anzeigt, ob die Proteine vom Adsorbens eluierbar waren und ferner ob ihre serologische Aktivität erhalten war.

Vergleich der Zonenlokalisierung durch Papierabdruck- und durch Elutionstechnik. Für die Isolierung der getrennten Proteinantigene war es notwendig, Sicherheit über die Lokalisation der Zonen zu gewinnen. Es wurden daher die Abhängigkeit des Papierabdruckes von der Proteinmenge im Träger und die direkte Segmentelution miteinander verglichen.

20 mg Antigengemisch (Sup. 76) wurden in Stärke bei 200 V, 17 mAmp bei +40 45 Std. der Elektrophorese unterworfen. Ein Papierabdruck wurde wie oben erwähnt genommen, mit Bromphenolblau angefärbt und eluiert. Der Stärkeblock wurde segmentiert, mit 0,01-n. NaOH eluiert und in den Segmenten die Proteine nach *Folin-Ciocalteu* bestimmt. Die Resultate wurden mit den durch Papierelektrophorese gewonnenen verglichen. Fig. 6 gibt die Ergebnisse dieser Versuche wieder.

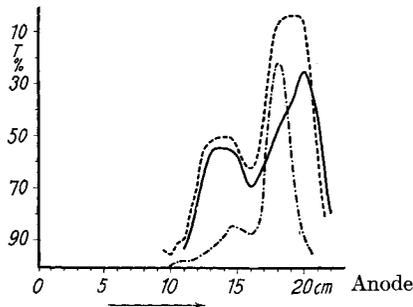


Fig. 6.

Vergleich der Elutionskurven von Tuberkuloprotein (Sup. 76) nach Zonelektrophorese in Stärke und in Filtrierpapier.

- Elution des mit Bromphenolblau angefärbten Papierabdruckes vom Stärkeblock.
- - - - *Folin-Ciocalteu*-Bestimmung der Stärke-Eluate.
- · - · Elution der Bromphenolblaufärbung nach Papierelektrophorese.

Die drei Verfahren zeigen ziemlich gute Übereinstimmung, wenngleich auch keine volle Deckung der Spitzen vorliegt.

Ein anderes Proteingemisch (AL 76) wurde ebenfalls in Stärke aufgetrennt und das Ergebnis mit dem der Papierelektrophorese verglichen. Der Papierabdruck von der Stärke wies drei Zonen auf, wie sie ähnlich auch in der Papierelektrophorese erhalten wurden (Fig. 7 a und 7 b).

Löslichkeit von Stärke oder verwandten Stoffen im Lösungsmittel. Wie oben beschrieben wurde, kam in unseren Versuchen gereinigte Stärke zur Anwendung. Zur Bestimmung der Löslichkeit der Trägersubstanz im Eluierungsmittel (0,9-proz. NaCl-Lösung) und damit zur Bestimmung eventueller Verunreinigungen in den isolierten Proteinen wurden folgende Versuche ausgeführt.

Ein Stärkesegment von 3 cm Länge, enthaltend 8,5 g Stärke, wurde wiederholt mit je 10 ml 0,9-proz. NaCl eluiert, dialysiert und lyophilisiert. 2,0–2,5 mg Stärke wurden mit je 10 ml Kochsalzlösung isoliert. Diese und ähnliche Versuche zeigten klar, dass Stärke als Verunreinigung in den zonelektrophoretisch getrennten Proteinen nicht vermeiden werden kann. Wege zur Verbesserung werden weiter unten beschrieben (Zonentransfertechnik).

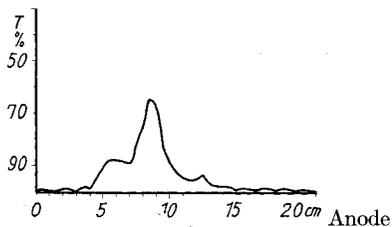


Fig. 7a.

Filtrierpapierelektrophorese von Tuberkuloproteingemisch (AL 76) in Veronalpuffer, pH=8,6,  $\mu=0,1$ , 200 V, 15 mAmp, 19 Std., +4°; 20  $\mu$ l einer 10-proz. Lösung;

Elutionskurve der Bromphenolblaufärbung.

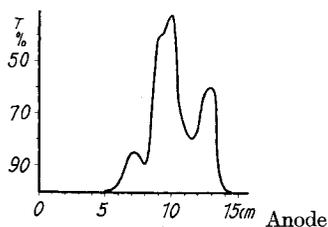


Fig. 7b.

Zonenelektrophoretische Trennung von AL 76 in Stärke; Veronalpuffer, pH = 8,6; 200 V, 15 mAmp, 42 Std., +4°. Papierabzug vom Stärkeblock mit Bromphenolblau angefärbt; 0,5-cm-Segmente mit je 5 ml 0,01-n. NaOH eluiert und bei 595  $m\mu$  gemessen.

Rückgewinnung der serologischen Aktivität nach Elektrophorese. Da es das Ziel unserer Versuche war, serologisch aktive Proteinantigene in möglichst homogener Form zu isolieren, musste festgestellt werden, ob die serologische Aktivität in den getrennten Proteinen wieder zu finden war. Eine Reihe von Versuchen wurden daher mit Stärke und Glaspulver (Topz ballotini, 0,1 mm) als Trägern durchgeführt. Als Proteingemisch diente die mit 70% Alkohol ausgefällte heterogene Tuberkuloproteinfraktion (AL 702), da sie hohe serologische Aktivität im Tannin-Hämagglutinationstest aufwies (Boydén & Sorkin)<sup>1</sup>).

Elution der Proteine aus Stärke und Glas, ohne Elektrophorese. a) 10 mg AL 702 wurden in 0,1 ml Veronalpuffer gelöst. Als Kontrolle wurden 10  $\mu$ l entnommen und mit 0,9-proz. NaCl-Lösung auf 1 ml verdünnt (1 mg/ml). Der Rest der Antigenlösung wurde mit einem 3-cm-Segment von Stärke bzw. Glas vermischt und sofort mit 9 ml Kochsalzlösung eluiert. Die Eluate und die Kontrollen wurden im Tannin-Hämagglutinationstest (Hemmungstechnik) auf Antigen titriert.

Mit diesem Test wurde ein Verlust an serologischer Aktivität weder bei den Stärke- noch bei den Glas-Eluaten festgestellt.

b) 10 mg AL 702 wurden in 0,1 ml Veronalpuffer gelöst. Zur Kontrolle wurden wieder 10  $\mu$ l entnommen und auf 1 ml verdünnt (1 mg/ml). Die Hauptmenge wurde mit Stärke bzw. Glas (3-cm-Segment) vermischt und über Nacht bei +4° stehengelassen. Die Mischungen wurden mit je 9 ml NaCl-Lösung eluiert und wie unter a) geprüft. Es wurde kein Verlust an serologischer Aktivität festgestellt.

Elution der Proteine aus Stärke und Glas, nach Elektrophorese. c) 10 mg AL 702 wurden in 0,1 ml Veronalpuffer gelöst. Als Kontrolle dienten 10  $\mu$ l, die mit NaCl-Lösung auf 1 mg Antigen/ml verdünnt wurden. Die restliche Lösung wurde mit Stärke bzw. Glas vermischt und in Stärke bzw. in einen Glasblock eingebracht. Ein Strom von 17 mAmp und 250 V kam 21 Std. für Stärke und 35 Std. für Glas bei +4° zur An-

wendung. Vermittels Papierabdruck wurden die Proteinzonen lokalisiert, dann wurden die Blöcke in 4-cm-Segmente unterteilt. Jedes Segment wurde mit 10 ml 0,9-proz. NaCl-Lösung eluiert. Die Eluate wurden wie unter a) serologisch geprüft. 50% der ursprünglichen serologischen Aktivität konnten aus Glas zurückgewonnen werden, hingegen nur 5% aus Stärke.

**Die Zonenübertragungstechnik.** Die Ergebnisse dieser und zahlreicher anderer ähnlicher Versuche wiesen darauf hin, dass die serologische Aktivität quantitativ von Glas und Stärke regeneriert werden kann, wenn ohne Elektrophorese gearbeitet wird. Unter den Bedingungen der Auftrennung in der Elektrophorese wurden jedoch grosse Verluste in Glas und ein fast totaler Aktivitätsabfall in Stärke festgestellt. Da Elektrophorese in Glas allein nur ungenügende Trennungen für unsere Proteine aufwies, konnte dieses Verfahren nicht für sich allein angewendet werden. Es schien daher erwünscht, zu untersuchen, ob sich die Trennschärfe in Stärke mit der Eluierbarkeit aus Glas mit Hilfe einer Zonenübertragungstechnik kombinieren liess. Die zuerst durch Stärkeelektrophorese getrennten und lokalisierten Proteinzonen wurden daher herausgeschnitten und jede Zone individuell in Glas übertragen. Die Proteine wandern dann unter den erneuten elektrophoretischen Bedingungen aus dem Stärkesegment in Glas hinein, aus welchem sie eluiert werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die schliesslich angewendete Technik.

**Beispiel I.** 150 mg AL 702 wurden in 0,4 ml Veronalpuffer gelöst, mit 1 g Stärke zu einem Brei vermischt und in den Stärkeblock (26 cm × 4 cm × 1 cm) eingetragen. Ein Strom von 17 mA bei 260 V wurde für 24 Std. bei +4° angewendet. Nach Lokalisation der Proteinzonen durch Auflegen und Anfärben eines Papierstreifens wurden die entsprechenden Stärkesegmente ausgeschnitten; in jedem Segment für sich wurde das Protein in einen Glasblock übertragen. Nach der Elektrophorese unter den gleichen Bedingungen wie im Stärkeversuch wurde jeweils der ganze Glasblock vom Ende des Stärkesegments her in einen Trichter eingebracht und mit total 40 ml NaCl-Lösung in kleinen Portionen gewaschen. Die vereinigten Eluate wurden gegen destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert. Es wurden so folgende Fraktionen isoliert: AL 702 A 15,3 mg; AL 702 B 40,5 mg; AL 702 C 10,0 mg.

Stärke konnte in keiner der Fraktionen festgestellt werden.

**Papierelektrophorese der getrennten Proteinfraktionen.** Die nach der oben geschilderten Weise getrennten Fraktionen wurden papierelektrophoretisch auf ihre Zusammensetzung geprüft. Die Technik wurde in der vorhergehenden Arbeit geschildert<sup>5)</sup>. Die angefärbten Papierstreifen wurden in Segmente geschnitten, mit 0,01-n. NaOH eluiert und die Farbstoffkonzentration gemessen (s. Fig. 8).

Wie Fig. 8 zeigt, wurde eine beträchtliche Reinigung erzielt. AL 702 A und AL 702 C scheinen kaum durch andere Komponenten verunreinigt zu sein, wohingegen AL 702 B nicht als homogen angesehen werden kann.

**Serologische Tests mit den aufgetrennten Proteinfraktionen.** Die serologische Aktivität der aufgetrennten Fraktionen wurde mit Kaninchen-anti-tb-Serum im Tannin-Hämagglutinationstest (Boydén 1951)<sup>23)</sup> unter Anwendung der Kreuzhemmungstechnik (Boydén & Sorkin)<sup>1)</sup> geprüft. Über die detaillierten Resultate werden wir an anderer Stelle berichten.

<sup>23)</sup> S. V. Boydén, J. exp. Med. **93**, 107 (1951).



*Serologische Tests mit den getrennten Proteinen.* In diesem Falle reagierte die Muttersubstanz (Sup. 76) nicht mit Kaninchen-anti-tb-Serum im Tannin-Hämagglutinations-test. Es war daher unmöglich, mit dieser Methode die getrennten Fraktionen auf eine eventuell verschiedene serologische Spezifität zu prüfen.

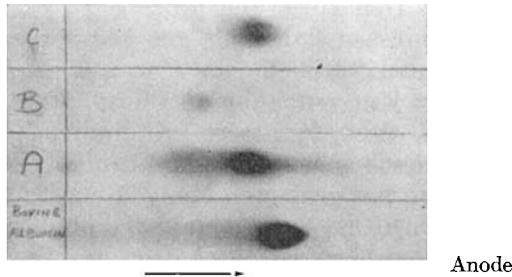


Fig. 9a.

Papierelektrophoretische Analyse der Tuberkuloproteinfraktion Sup. 76 vor und nach der Trennung durch die Stärke-Glas-Transfertechnik.

- A = Original Sup. 76
- B = Komponente 1 von Sup. 76
- C = Komponente 2 von Sup. 76

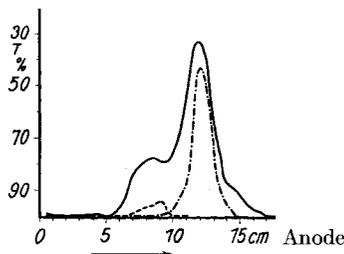


Fig. 9b.

Spektrophotometrische Analyse der unter Fig. 9a erhaltenen, mit Bromphenolblau angefärbten Proteinkomponenten nach Elution des Farbstoffs mit 0,01-n. NaOH.

- Sup. 76
- - - - - Komponente 1 von Sup. 76
- · - · - Komponente 2 von Sup. 76

### Diskussion

In der vorliegenden Arbeit kam die kürzlich eingeführte Methode der präparativen Zonenelektrophorese zur Anwendung. Während es zweifelhaft ist, ob es je gelungen ist, serologisch, chemisch und physikochemisch homogene Tuberkuloantigene zu gewinnen (*Boyden & Sorkin*<sup>24</sup>), konnten hier mit Hilfe einer Kombination von Elektrophorese in Stärke und Glas Tuberkuloproteingemische zumindest teilweise aufgetrennt werden. Die Hauptschwierigkeit der benutzten Zonenübertragungsmethode liegt nicht in einer mangelhaften Auf-

<sup>24</sup>) S. V. Boyden & E. Sorkin, Adv. Tuberc. Res. 7, 17. S. Karger, Basel/New York 1956.

trennung, sondern vermutlich in der irreversiblen Adsorption der Proteine in Stärke unter den elektrophoretischen Bedingungen. Die quantitative Rückgewinnung der Proteine aus Stärke beim Arbeiten ohne Anwendung von Strom lässt schliessen, dass während der Elektrophorese irreversible Denaturierungsprozesse zu Verlusten führen. Ausbeuten von 50 % müssen daher als gut bezeichnet werden. Verluste ähnlicher Art wurden kürzlich von *Harris & Mehl*<sup>9)</sup> bei der zonen-elektrophoretischen Untersuchung an Phosphatasen beobachtet.

Es ist fraglich, ob viel grössere Proteinmengen als die hier angewendeten mit der beschriebenen Methode aufgetrennt werden können. Vorläufige Versuche mit grösseren Mengen von Stärke und Antigenen ergaben nur starke Diffusionserscheinungen ohne scharfe Trennzonen.

Über die serologischen Eigenschaften und die chemische Zusammensetzung der getrennten Antigene und über Abtrennung von anderen Tuberkuloantigenen soll später berichtet werden.

#### SUMMARY.

Preparative zone electrophoretic separations of tuberculo-proteins by a zone transfer technique from starch into glass are described.

Various paper electrophoretic and serological tests were used to ascertain the state of purity of the isolated fractions.

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

### 188. Transpositions d'hydroxy-diquinones I.

#### Préparation de l'hydroxy-2-diméthyl-4,4'-diquinone-3,6,3',6'<sup>1)</sup> et du penta-hydroxy-2,3,6,3',6'-diméthoxy-4,4'-diphényle

par Th. Posternak, W. Alcalay et R. Huguenin.

(13 VI 56)

Les recherches exposées ci-après ont leur origine dans des travaux sur des pigments de champignons inférieurs. L'un de nous<sup>2)</sup> avait montré autrefois que la *phoenicine*, pigment de *Penicillium phoeniceum* et de *Penicillium rubrum*, représente la dihydroxy-2,2'-diméthyl-4,4'-diquinone-3,6,3',6' (dihydroxy-2,2'-ditoluquinone-4,4')

<sup>1)</sup> Nous avons effectué, il y a déjà plus de 12 ans, la préparation de cette substance (voir *W. Alcalay*, thèse, Lausanne 1944; cf. communication au XIVe Congrès International de Chimie de Zurich (26. 7. 1955), résumés des communications p. 28).

<sup>2)</sup> *Th. Posternak*, *Helv.* **21**, 1326 (1938); *Th. Posternak, H. Ruelius & J. Tcherniak*, *Helv.* **26**, 2034 (1943).