

Acta Medica Okayama

Volume 3, Issue 4

1932

Article 4

AUGUST 1933

Zur Methode der Mikroelektrodialyse und ihre Anwendung auf die Isolierung der Serumprazipitine.

Takeichi Asaba*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

Zur Methode der Mikroelektrodialyse und ihre Anwendung auf die Isolierung der Serumprazipitine.*

Takeichi Asaba

Abstract

1. Es ist möglich das Serum in geringer Menge durch den von mir modifizierten Paulischen Apparat zu mikroelektrodialysieren. 2. Die ImmunKörper werden sicher vom Antigen-Antikörper-Komplex durch M.E.D.I. isoliert. 3. Das Prazipitin wird bei einer Spur Kochsalz durch die M.E.D.I. isoliert und zwar findet es sich im kathodischen Raum. 4. Kochsalz spielt bei der Isolierung des Immunstoffes durch M.E.D. eine große Rolle. Es wird dabei immer eine Spur Kochsalz benötigt, doch wirkt eine große Menge Kochsalz umgekehrt hemmend auf die Isolierung. 5. Bei der M.E.D.I. der Janusgrun-Kongorot-Bindung wirkt jedoch das Kochsalz immer hemmend auf die Isolierung ein. 6. In dieser Weise wirkt das Kochsalz auch hemmend auf die Kataphorese der Janusgrunlösung. Diese Untersuchung wurde von mir unter der wertvollen Leitung und liebenswürdigen Unterstützung von Herrn Prof. M. Ogata ausgeführt, dem ich hiermit für alle Hilfe und für freundliche Ratschläge herzlich danke.

Aus dem Hygienischen Institut der Med. Fakultät Okayama
(Vorstand: Prof. Dr. M. Ogata).

**Zur Methode der Mikroelektrodialyse und ihre
Anwendung auf die Isolierung
der Serumpräzipitine.**

Von

Takeichi Asaba.

Eingegangen am 30. August 1932.

In meiner vorausgehenden Mitteilung wurde über die Isolierung des Serumpräzipitins durch Aussalzung mit Ammoniumsulfat und durch Elektrolyse (E.D.) und über die Antigenität der Serumfraktionen berichtet¹⁾. In der vorliegenden Abhandlung machte ich weitere Untersuchungen über die Mikroelektrodialyse und über die Isolierung des Immunstoffes durch die von mir ausgeführte Mikroelektrodialyse (M.E.D.).

A. Mikroelektrodialyse.

Bei meinen eigenen Versuchen mit E.D. stieß ich auch auf verschiedene Schwierigkeiten, die schon *Ettisch* u. *Ewig*¹⁰⁾ beobachteten. Deshalb muß man wenigstens die folgenden Bedingungen berücksichtigen.

1. Auswahl des Apparats.
2. Benützung von unverdünntem Serum.
3. Vermeidung starker Reaktionsverschiebungen.
4. Schnelle Fraktionierung unter Vermeidung der Temperatursteigerung im Medium.
5. Halbe Ausfällung der Serumproteine.

1. *Auswahl des Apparats.* Zu meiner Untersuchung habe ich hauptsächlich die Apparatur von *Paul*³⁷⁾ benutzt, aber ich habe sie zum Zweck der Untersuchung etwas umgebildet. Sie besitzt bei langem Elektrodenabstand zu kleine Elektrodenflächen, so erweist sie sich im Verhältnis zur Maße als ungünstig. Dieses schlechte Verhältnis ergibt sich aus folgender Überlegung: Liegt z.B. eine gegebene Spannung vor, so wird bei großen Elektrodenflächen und kleinem Elektrodenabstand der Widerstand der Mittelkammer schwach sein, daher steigt die Stromstärke erheblich. Damit ist ein rascher Abtransport der Ionen gegeben.

*Ruppel*⁴²⁾ hatte schon durch die Konstruktion seiner dreiteiligen Tonzelle einen bequemeren Apparat als *Pauli* geschaffen, der dem Maßverhältnis Rechnung trug. Sein Vorteil liegt eben in der relativ schmalen Mittelkammer und den relativ großen Elektrodenflächen. Doch kann man mit diesem Apparat, wie beim *Paulischen* Glasapparat, die zeitliche Veränderung des Mediums bei Stromschließung nicht genau beobachten, besonders sind bei E.D. des Serums die in der Mittelkammer vor sich gehenden Veränderungen schwer sichtbar. Vor kurzem haben *Ettisch* u. *Runge*¹¹⁾ daher einen verbesserten Apparat hergestellt, der aus einem Glaskasten besteht, in welchen zwei auf Glasrahmen geklebte Membranen in eingeschliffene Rillen eingelassen werden. Damit kann man bei jeder beliebigen Flüssigkeitsmenge zwischen 1 und etwa 50 cc mit gutem Erfolg elektrodialysieren.

Um Serum zu mikroelektrodialysieren, modifizierte ich den *Paulischen* Apparat in folgender Weise: Anstatt der großen Mittelkammer ließ ich eine kleine Mikrozelle aus reinem Glas herstellen mit einer Breite von etwa 0.4 und einem Durchmesser von 3 cm und eine andere mit einer Breite von etwa 0.2 und einem Durchmesser von 1.5 cm. So kann man bei Benutzung der ersteren 2.7 bis 2 cc, und der letzteren 0.5 cc Serummenge elektrodialysieren.

2. *Benutzung von unverdünntem Serum.* Gewöhnlich wird bei E.D. mehr oder weniger verdünntes Serum benutzt. Theoretisch scheint es wahrscheinlich, daß die Proteine und sonstigen Bestandteile des Serums im nativen Zustand mit einer bestimmten inneren Struktur miteinander koordinieren, und daß bei Verdünnungen je nach der chemischen oder physikalischen Eigenschaft irgendeine Veränderung des Serumbestandteils hervorgerufen wird. Diese Tatsache zeigt sich deutlich, wenn man die Resultate der E.D. beim verdünnten und beim unverdünnten Serum vergleicht. Vor allem sind große Änderungen im dielektrischen Sinne nachweisbar. Deshalb muß man bei E.D. verdünntes Serum möglichst vermeiden.

3. *Vermeidung starker Reaktionsverschiebungen.* Wenn man bei E.D. des unverdünnten Serums, wie gewöhnlich, zwei negative Membranen (Kollodium- oder Pergamentmembrane) anwendet, so ist es schwer, das Globulin in einwandfreier Weise darzustellen, weil die negative Membrane an der Anodenseite die Anionen aus der Mittelkammer nicht leicht durchpassieren läßt. Es kommt infolgedessen zu einer Säuerung, so daß das früher gefällte Globulin bei seinem Auflösungspunkt von etwa pH 4.0 zum Teil wieder aufgelöst wird. Nur bei relativ starken Verdünnungen des Serums gelingt es, das starke Sauerwerden zu vermeiden. Andererseits wird ebenfalls nach *Pauli* in der E.D. bei niederen Stromspannungswerten mit verdünntem Serum diese Säuerung vermieden. Doch muß man sich dabei auf eine lange Dauer gefaßt machen.

Um die Unannehmlichkeit dieser starken Reaktionsverschiebung ins saure Gebiet zu beseitigen, haben *Ruppel* u. Mitarbeiter⁴²⁾ mit vollem Recht ihr Hauptaugenmerk auf die Membraneigenschaften hinsichtlich ihrer Anion- bzw. Kationdurchlässigkeit gerichtet; nach ihrer Meinung wird die Ionendurchlässigkeit wesentlich durch die Membrane selbst stark beeinflusst. Sie haben für die Anodenseite der Dialysierzelle im Anschluß an die Versuche von *Bethe* u. *Toropoff*²⁾ eine positiv geladene Chromgelatinemembrane angebracht. Hierdurch wird ein Absperrern der Anionen in ganz erheblichem Umfange vermieden, aber statt der Verschiebung ins saure Gebiet erfolgt nunmehr nach *Ettisch* u. *Beck*⁹⁾ im Anfangstadium der E.D. eine starke Alkalisierung bis zu Werten von pH 11.0. Durch Benutzung alter Membrane

ließ sie sich auf pH 9.9 und vielleicht noch etwas weiter herabdrücken. Die Ursache dafür lag in einer Abgabe von Ammoniumionen aus der Chromgelatinemembrane. Ein langes Verbleiben in der alkalischen Reaktion ist aber nach *Ettisch*⁸⁾ sehr bedenklich, da die Eiweißkörper stark verändert werden, besonders weil dabei schwer lösliche Kondensationsprodukte gebildet werden. Dazu kommt noch, daß die weitere Wirkung der Ammoniumionen auf das Eiweiß nicht zu übersehen ist. Nur durch starke Verdünnung des Serums läßt sich eine Alkalisierung des Mediums teilweise vermeiden. Deshalb hat *Ettisch*⁸⁾ selbst die E.D. mit der Chromgelatin-Pergamentmembrane-Kombination als keineswegs ideal bezeichnet.

Ruppel u. Mitarbeiter⁴²⁾, sowie *Stern*⁴³⁾ erstrebten es, bei Darstellung des Globulins durch E.D., die weitere Entfernung vom Neutralpunkt zu vermeiden. Sie haben mit verdünntem Serum gearbeitet. Doch fehlt in ihrem Bericht eine Angabe, ob alles Globulin ausgefällt war, besonders wie viel Globulin sich im Niederschlag fand. *Ettisch* u. *Beck*⁹⁾ konnten zuerst zeigen, daß die Globulinausfällung bei der E.D. durch zwei Faktoren zustande kommt: etwa 50% des Serumeiweißes flockt infolge Elektrolytentzuges aus, der Rest wird durch Überführung des Serums in die Zone (etwa pH 7.0 bis 4.0) ausgefällt, in der das Globulin ein Stabilitätsminimum besitzt. Wenn man ohne Erreichung des isoelektrischen Punktes (i.P.) und ohne maximale Entfernung der Elektrolyte das Globulin ausfällen läßt, so ist die Gewinnung des Globulins unvollständig. Da nun der i.P. der Serumeiweißkörper bei pH 5.4 für Globulin und 4.7 für Albumin liegt, abgesehen von noch anderen anwesenden Körpern, so ist theoretisch eine restlose Fraktionierung ohne Reaktionsverschiebung des Serums nicht möglich. Der pH-Wert muß einen Übergang in saure Gebiet bis etwa 4.7 aufweisen.

Bei einer idealen E.D. sind am Schluß alle Elektrolyte entfernt, und nur die nicht dialysierbaren Eiweißkörper zurückgeblieben. Da das Eiweiß Ampholyte darstellt, so hängt nach Entfernung der Elektrolyte die Reaktion des Mediums (1) von den Ampholyten bzw. ihren i.P. und (2) von den besonderen Eigenschaften der Membrankombination ab. Wenn die letzte Bedingung außer Acht gelassen wird, so werden die i.P. der in der Lösung vorhandenen Eiweißkörper zusammen mit der Herstellung des CO₂-Gleichgewicht für den Endpunkt maßgebend sein. Unter dem Einfluß der Membranwirkung wird dagegen durch die Fähigkeit der Membrane, Anion bzw. Kation in besonderer Weise durchzulassen eine Reaktionsverschiebung eintreten. In besonderen Fällen spielt das HCO₃' eine große Rolle. Auf die Entfernung dieses Ions folgt eine Absorption aus der Luft bis zu einem ganz bestimmten Gleichgewichtszustand, bei dem genau so viele Ionen an der Elektrode abgeschieden werden, als von der Luft absorbierte CO₂ Ionen nachgeliefert werden.

Der ideale Vorgang der E.D. in Bezug auf die Reaktionsverschiebung darf daher nur so verlaufen, daß ohne Zunahme der normalen Alkaleszenz die Reaktion des Serums ganz allmählich von ihrem Ausgangspunkt (etwa 4.7 bis 8.5) bis zum i.P. der gelösten Serumeiweißkörper gelangt (etwa 4.7), ohne erheblich ins saure Gebiet hineinzugeraten. Jede stärkere Säuerung kann, wie *Ettisch* u. *Runge*¹¹⁾ zeigten, eine Wiederauflösung des Globulins zur Folge haben.

Höber u. seine Mitarbeiter¹⁷⁾ kamen zum Schluß, daß die Eiweißmembranen amphoterer Charakter besitzen. Die eingehenden Versuche von *Michaelis* u. Mitarbeitern³⁴⁾ haben wiederum gezeigt, daß die Membranefähigkeit, Anionen oder Kationen durchtreten zu lassen, mit dem amphoterer Charakter der Membrane

weitgehend verknüpft ist. Bei Verwendung geeigneter amphoterer Membrane wurde alsdann ein Ansteigen auf der alkalischen Seite vollkommen vermieden, während die Säuerung ebenfalls bis zu einem gewissen Grad nicht mehr neutralisiert werden kann.

Meine in dieser Arbeit benutzten Membranen wurden nach der Arbeiten von *Ettisch* u. *Ewig*¹⁰⁾ in folgender Weise hergestellt: 1. Eieralbumin-Kolloidiummembrane. Feinst pulversiertes Eieralbumin (Merk) wurde einige Stunden lang mit Kolloidiumlösung in Äther-Alkoholgemisch (Merk) gut geschüttelt, um die groben Teilchen sich niederschlagen zu lassen. Diese Albumin-Kolloidiumlösung wurde in dünner Schicht auf eine glatte Glasscheibe ausgegossen. Nach etwa einer halben Stunde wurde dann ohne Alkoholspülung sofort mit dest. Wasser gewässert, so daß sich nach etwa 5 bis 10 Minuten die vollkommen homologene Membrane ablöste. Sie zeigt eine Lichtdurchlässigkeit, wie eine feine Milchglasscheibe, und ist nach 24 stündiger Wässerung gebrauchsfähig. 2. Gelatinmembrane. Eine Kolloidiummembrane wurde nach 24 stündiger Wässerung in eine 2%ige wässrige, isoelektrische (4.7) Gelatinlösung eingetaucht und über Nacht stehen gelassen. Nach 48 stündiger Wässerung der Membrane wird sie brauchbar. Vor die negative Seite legte ich immer eine Pergamentmembrane.

4. *Schnelle Fraktionierung unter Vermeidung der Temperatursteigerung im Medium.* Als ein wichtiges Moment bei der E.D. muß die Temperaturgrenze des Mediums gelten und die Temperatur des Inhaltes in der Dialysierzelle muß innerhalb einer bestimmter Grenze beibehalten werden. Besonders wenn man Wert auf native Proteine legt, so muß man die Temperatur, die zur Denaturierung der Eiweißkörper führt, mit Vorsicht vermeiden. Andererseits muß man für möglichst rasche Fraktionierung sorgen. Die rasche Fraktionierung wird durch Arbeiten mit großen Stromstärken erzielt. Dieses aber hat wiederum zur Folge, daß durch Bildung von *Joulescher* Wärme eine beträchtliche Temperaturerhöhung eintritt. Dabei sind eingelegte Kühler nur von relativ geringer Wirkung, um die Temperatursteigerung zu vermeiden. Schnelle Fraktionierung wird auch bei Berücksichtigung des sehr labilen Zustandes der Proteine erwünscht, die im elektrischen Feld aus ihren normalen Zustandsbedingungen entfernt werden. In diesem Dilemma kann man diejenige Membrankombination anwenden, die eine für beide Ionenarten möglichst gleich rasche Durchwanderung bei möglichst guter Wärmeleitung zuläßt. Wiederum kommt es also auf eine passende Membrane an und man kann einen guten Erfolg mit einer Eieralbumin-Kolloidiummembrane vor der Anode und einer Pergamentmembrane vor der Kathode erzielen.

5. *Halbe Ausfällung der Serumproteine.* Schließlich bleibt noch die Frage, inwieweit mit obiger Membrankombination eine vollständige Fraktionierung der Proteine möglich sei. Praktisch muß man zufrieden sein, wenn man eine vollständige Globulinausfällung bekommt, also etwa 50% des Serumeiweißes. Es taucht hierbei noch die Frage auf, ob der bei der E.D. gewonnene Eiweißniederschlag mit den Proteinen, die durch die Salzfällungsmethode gewonnen werden, identisch sei. Die von *Ettisch* u. *Sachsse*¹²⁾ ausgearbeitete Methode der Affinitätsbestimmung von Protein zu Kupfer ergibt, daß das durch ein Drittel der Ammoniumsulfatsättigung erhaltene Euglobulin mit der Globulinfraktion bei der E.D. übereinstimmt. Bei meiner eigenen Untersuchungsmethode wurden die Pergamentmembranen vor den beiden Polen angebracht und dann das verdünnte Serum zur E.D. benutzt. Über den durch E.D. gewonnenen

Niederschlag machte ich bezüglich seiner Eigenschaften eine serologische Untersuchung. Dabei fand ich, daß das Globulin durch E.D. von dem durch Aussalzung gewonnenen Globulin etwas verschieden ist, und daß das erstere aus einer höchst kleinen Menge von Albumin und aus einer großen Menge von Pseudo- und Euglobulin besteht. Der Unterschied zwischen dem Ergebnis von *Ettisch* u. *Sachsse*¹²⁾ und dem meinen besteht darin, daß die Untersuchungsmethode differiert.

Den elektrischen Strom entnahm ich direkt einer Gleichstromleitung von 100 Volt Spannung. Im Anfang der E.D. darf man aber nicht die ganze Spannung verwenden, wenn die Mittelkammer eine gut leitende Flüssigkeit, wie das Serum, enthält. Durch die große Stromstärke erfolgt dann eine zu starke Erwärmung, wodurch das Serum völlig denaturiert wird. Bei der E.D. soll man aber niemals die Temperatur über 30°C hinaus ansteigen lassen. In der Mikrozele darf der elektrische Strom niemals 60 bis 70 Milliamp. überschreiten. Deshalb legte ich einen entsprechenden Vorschaltwiderstand in der Form eines Lampenwiderstandes davor und regulierte dadurch die Stromstärke. Im Verlaufe der E.D. mit verschiedenen Serumarten, die von *Ettisch* u. *Ewig*¹⁰⁾ bearbeitet worden sind, wird als einfacher und bester Indikator für die Höhe der zu verwendenden Stromstärke stets die Temperatur in der Mittelkammer angegeben. Infolgedessen ist für praktische Zwecke statt der Benutzung eines Milliampometers der Gebrauch eines in die Mittelkammer gelegten Thermometers zu empfehlen. Man läßt also zu Beginn der E.D. für kurze Zeit den ganzen Strom hindurch und schaltet bei Anstieg der Temperatur jeweils so viel Widerstand ein, daß die Temperatur stets unter 30°C gehalten wird. Mit zunehmendem Elektrolytentzug sinkt nach 10 bis 20 Minuten die Temperatur wieder, und schrittweise schaltet man den Widerstand weiter aus. In der Regel kann man nach 20 Minuten E.D. den Widerstand ganz entfernen. Dann setzt man die E.D. so lange fort, bis die Temperatur der Mittelkammer die Ausgangstemperatur wieder erreicht. Bei Benutzung der geeigneten Membrankombination kann man nach 1 Stunde mit der E.D. des Serums in der Mikrozele aufhören.

Als wichtiges Moment habe ich beim Studium der Membranwirkungen während der E.D. das Verhalten der Reaktion in der Mittelkammer erkannt. Ich habe zu dem Zwecke stets elektrische pH Messungen ausgeführt. Es ist von besonderer Bedeutung festzustellen, ob im Anfang der E.D. eine Reaktionsverschiebung nach der alkalischen Seite erfolgt. Für eine einwandfreie E.D. des Serums haben *Ettisch* u. *Ewig*¹⁰⁾ gefordert, daß die Reaktion weder stärker ins alkalische Gebiet geht, als etwa der Ausgangsreaktion des Serums entspricht, noch im weiteren Verlauf wesentlich unter pH 5.0 heruntergeht.

Ich habe zur Kontrolle des Verlaufs der E.D. aller 10 Minuten oder in noch kürzeren Abständen eine Probe gemacht zur Bestimmung des pH-Wertes und ebenso des Eiweißgehaltes und zwar am Anfang und am Ende. Zu häufigen elektrischen pH Messungen scheint mir der Inhalt der Mikrozele ungenügend. Aber der von mir modifizierte kleine Apparat für die pH Messung, bei dem statt der großen Elektrode eine kleine in einem schmalen Röhrchen eingeschaltet wird, ist auch bei geringerer Inhaltsmenge für die pH Messung geeignet. Es ist wichtig, vor der Prüfung der Reaktion mit einem Glasstab oder Thermometer die Flüssigkeit der Mittelkammer gut zu mischen. Ferner ist streng darauf zu achten, daß man mit der Pipette die Membranen nicht direkt berührt, weil die Reaktion in unmittelbarer Nähe der Membranen von der in der Mitte der Kammer stark verschieden ist.

Für die Bestimmung des Eiweißgehaltes wurde ein Eintauchrefraktmeter von Zeiss benutzt. Es ist wohl klar, daß die Refraktmetrie nicht absolut genaue Eiweißwerte ergibt, da der Brechungsexponent der einzelnen Eiweißkörper des Serums wechselt und da ein Teil der Nichteiweißkörper auch brechend wirkt. Aber diese Abweichungen spielen gegenüber den großen Differenzen, die die Ausfällung des Globulins ergibt, eine untergeordnete Rolle.

Experiment 1.

(Albumin-Kollodiummembrane vor der Anode,
Pergamentpapier vor der Kathode).

Die Versuche wurden mit 2 cc und 0.5 cc von Antirinderserum vorgenommen. Wie Tabelle 1 zeigt, ist nach Verlauf von 1 bis 1.1/2 Stunden die E.D. beendet. Dabei zeigt sich eine Temperatursteigerung in der Mittelkammer zwischen 20°C und 26°C. Die pH-Kurve verläuft in den ersten 15 Minuten langsam bis zur Neutralitätsgrenze, in den nächsten 25 Minuten schnell zu pH 4.8, darauf wird die Kurve wieder flacher und erreicht nach 1.1/2 Stunde mit pH 5.2 den Endpunkt. Die Ursache für diese pH Veränderung ist darin zu suchen, daß die Hydrolyse um so stärker werden muß, je länger die E.D. dauert, da ja, wie *Ettisch* u. *Ewig*¹⁰⁾ beobachteten, die Kationen die Mittelkammer schneller verlassen als die Anionen. Daneben beteiligt sich an diesen pH Veränderungen der Faktor, daß es dem Serum eine Zeitlang möglich ist, diese Reaktionsverschiebung teilweise wegzupuffern. Die Elektrolyte in der Mittelkammer werden allmählich während der E.D. entzogen, die Eiweißkörper vermindern auch ihre Pufferkapazität und so wird die pH Änderung stärker. Schließlich wird die Pufferwirkung der Proteine erschöpft und die Elektrolyte entfernen sich. Dieser Zustand dauert nicht lange. Unter dem Einfluß anderer Ionen tritt eine Auswanderung der H-Ionen ein und es beginnt eine rückläufige Reaktion zum Neutralpunkt (Tabelle 1).

Tabelle 1. Albumin-Kollodiummembrane vor der
Anode, Pergamentmembrane vor der Kathode.

A.

Mikroelektrodialyse (2.5 cc).

Versuchsdauer Min.	Stromstärke mA.	Temperatur °C	pH	Eiweißgehalt %	Prätipit. Titer	
					B.Z.	V.T.
0	0	20	8.2	7.0	500	1000
5	60	26	8.2	///		///
10	60	26	8.2	///		///
20	60	26	6.6	///		///
30	13.5	23	6	///		///
40	6	23	4.8	///		///
60	1.5	20.5	5.5	///		///
75	1.5	20.5	5.4	///		///
90	1	20	5.2	3.7	500	500

B.
Mikroelektrodialyse (0.5 cc).

Versuchs- dauer Min.	Stromstärke mA.	Temperatur °C	pH	Eiweißgehalt %	Präzipit. Titer	
					B.Z.	V.T.
0	0	22	8.2	7.0	500	1000
20	20	26	/	/	/	/
90	0.5	22	4.9	3.7	500	500

B.Z. = Bindungszone nach der *Ogataschen* Methode.

V.T. = Verdünnungstiter nach der *Ogataschen* Methode.

Das ausgefällte Eiweiß beträgt regelmäßig ca. 50% der im Serum vorhandenen Proteine. Wie in der Tabelle 1 ersichtlich ist, wurde der Titer des Präzipitins vor und nach der E.D. bestimmt. Von den Antikörpern sind nach der E.D. bei dieser Membranekombination sicher 50% im Niederschlag nachweisbar. Wenn auch die geringe Menge von 0.5 cc des Antiserums als Versuchsmaterial gebraucht wird, so kann man doch sicher, ebenso wie bei der E.D. von 2 cc des Serums, 50% des Immunstoffes fraktionieren.

Experiment 2.

(Gelatinmembrane vor der Anode und Pergamentpapier
vor der Kathode).

In diesem Versuch wurden 2 cc von Antirinderserum dialysiert. Wie Tabelle 2 zeigt, war der Verlauf der E.D. ungefähr der gleiche wie in Experiment 1. Dabei schwankt die Temperatur in der Mittelkammer zwischen 17°C und 28°C. Von den Antikörpern wurden auch nach der E.D. bei dieser Membranekombination 50% im Niederschlag nachgewiesen. Die ausgefällte Eiweißmenge beträgt ebenfalls, wie bei der vorhergehenden Membranekombination ca 50% der im Serum vorhandenen Proteine (Tabelle 2).

Tabelle 2. Gelatinmembrane vor der Anode,
Pergamentmembrane vor der Kathode.

Versuchs- dauer Min.	Stromstärke mA.	Temperatur °C	pH	Eiweißgehalt %	Präzipit. Titer	
					B.Z.	V.T.
0	0	17	8.2	7.0	500	1000
5	60	28	8.3	/	/	/
10	10	28	8.3	/	/	/
20	10	25	8.2	/	/	/
30	5	20	8.1	/	/	/
45	4	20	6.5	/	/	/
60	3.5	18.5	4.9	/	/	/
70	1.8	18.5	4.9	/	/	/
90	1.8	18	4.9	/	/	/
120	1	17	4.9	3.7	500	500

Der pH-Verlauf ist dabei etwas anders als in der früheren Membranekombination, weil die Kurve in den ersten 35 Minuten langsamer zur Neutralitätsgrenze verläuft als bei der anderen Membranekombination und in den nächsten 25 Minuten sich viel schneller zu pH 4.9 bewegt und den Endpunkt erreicht.

Die obigen zwei Versuchsreihen kann man kurz folgenderweise zusammenfassen: Es ist möglich, das Immunserum mit dem von mir modifizierten *Paulischen* Apparat zu mikroelektrodialysieren und fast gleiche Resultate wie mit der Membranekombination von *Ettisch* u. *Ewig*¹⁰⁾, zu erzielen.

B. Isolierung des Antikörpers mittels Mikroelektrodialyse (M.E.D.I.).

Die Reindarstellung des Antikörpers aus Immunserum hat nicht nur eine theoretische Bedeutung, sondern auch eine unmittelbare Beziehung zur praktischen Medizin. Deswegen sind bis heute in Bezug auf die Isolierung der Antikörper viele Untersuchungen vorgenommen worden. Die zur Antikörperisolierung angewandten Methoden lassen sich als chemische, physikalische und biologische, resp. als Kombination dieser drei Arten unterscheiden.

Die chemische Methode. Die Konzentrierung der Immunkörper wurde zunächst aus klinischen Bedürfnissen heraus mit dem Antitoxinserum versucht. Die chemische Methode besteht darin, daß sie den Antikörper mit dem Eiweißfällungsmittel mitfällt. Im erhaltenen Niederschlag finden sich dann die konzentrierten Antikörper. Durch Sättigung mit Magnesiumsulfat oder Halbsättigung mit Ammoniumsulfat werden die Antitoxine gleichfalls mit Serumglobulin ausgefällt. Die Ausfällungsmethode wurde zuerst von *Tizzoni* u. *Cattani*⁴⁶⁾ angewandt und sie erbrachte schon in Jahre 1891 den Nachweis, daß das Tetanusantitoxin nicht dialysierbar, also ein Kolloid ist, und daß es durch Alkohol oder Ammoniumsulfat gefällt wird. Mit Schwermetallsalzen wurde neuerdings die Isolierung der Globuline zur Darstellung der Antitoxine aus Diphtherieserum von *Freund* u. *Sternberg*¹³⁾ dargestellt, nachdem unterdessen schon durch die Untersuchungen von *Dieudonné*⁷⁾ oder von *Belfanti* u. *Carbone*³⁾ gezeigt worden war, daß der Antidiphtherietoxingehalt der Globuline von ihrer Darstellungsmethode abhängt. Wenn man die Arbeiten bezüglich der Beziehungen zwischen Globulin und Antikörper prüft, so findet man, daß zuerst von *Pick*³⁸⁾ die fraktionierte Aussalzung der Globuline in Anwendung gebracht worden war. *Widal* u. *Stcard*⁴⁷⁾ fanden die Bakterienagglutinine in Serumglobulinteil. *Brunner* u. *Pinkus*⁶⁾ haben ein Verfahren zur Reinigung der Heilsera veröffentlicht, in dem Natriumsulfat zur fraktionierten Aussalzung an Stelle des Ammoniumsulfats benutzt wurde. Das Diphtherieantitoxin wurde im Pferdeserum in den mittleren Fraktionen, die den Pseudoglobulinen entsprechen, stark konzentriert. In Bezug auf andere Immunkörper habe ich in meinen vorausgehenden Arbeiten¹⁾ genau berichtet.

Die physikalische Methode. In diese Methode will ich ein Verfahren, daß den

Antikörper durch E.D., Ultrafiltration und Elektroultrafiltration u.a. darstellen kann, einschließen. Diese Methoden sind auf der Basis der kolloidalen Auffassung der Immunkörper aufgebaut, wie sie zuerst von *Landsteiner*³⁰⁾, dann *Hirschfeld* u. *Klinger*¹⁸⁾, *Pauli* u. seinen Mitarbeitern³⁷⁾, *Michaelis* u. *Rona*³⁵⁾ entwickelt wurde. Im engeren Sinne wird die Darstellung der Immunkörper durch diese Methode bedeutend verbessert. Nach ihren Vorstellungen wird der spezifische Charakter des Immunkörpers als kolloidale Zustandänderung der Serumproteine, besonders der Globuline aufgefaßt. Da der Dispersitätszustand eines Kolloides stets von der Teilchengröße des Kolloides bedingt wird, so kann man für Immunsera die zuerst von *Bechhold*⁴⁾ zur Untersuchung und Trennung verschiedener Kolloide angegebene Ultrafiltration anwenden, und so wäre unter geeigneten Bedingungen eine Trennung der wirksamen von den unwirksamen Kolloiden möglich. *Giemsa* u. *Godoy*¹⁵⁾ haben aus diesem Gedankengang heraus als erste die Untersuchungen angestellt und mit bestimmten Ultrafiltern ein etwa dreifach wirksames Antitoxin auf dem Filter gefunden. *Henseval*¹⁹⁾ hat die verschiedenen Verhältnisse der mit dünnen Kollodiummembranen durch Dialyse isolierten Globuline und Albumine festgestellt. Bei Filtration durch Kollodiummembrane unter Druck sind das Pseudoglobulin und Antitoxin schwer durchlässig, jedoch bleibt der größere Teil der Antitoxine und Globuline auf dem Filter zurück. *M. u. N. Stern*⁴³⁾ waren imstande auch die Globuline auf dem Filter zurückzuhalten. *Pauli*³⁷⁾ erzielte durch E.D. die vollständige Trennung der hydrophilen Albumine von den hydrophoben Globulinen. *Ruppel* u. seine Mitarbeiter⁴²⁾ studierten noch genauer die spezifischen Wirkungen des Elektroosmoseprozesses und kamen zu dem Schluß, daß die Trennung der einzelnen Eiweißkörper durch E.D. nicht nur auf der Beseitigung der Salze aus dem Serum im 3-Zellen-Apparat beruht, wodurch antitoxinfreies hydrophobes Euglobulin ausfällt, sondern daß sie vielmehr von den direkten Einwirkungen des elektrischen Stromes auf die gelösten Eiweißkörper abhängt, wodurch die Wanderungsrichtung und die Geschwindigkeit des Eiweißkörpers mitgeteilt werden. Zur Antikörperkonzentration, insbesondere zur Reindarstellung der Antitoxine haben neuerdings *Wernicke*⁴⁸⁾, *Wernicke* u. *Modern*⁴⁹⁾ mit Erfolg die E.D. verwandt. *Lock* u. *Hirsch*²⁸⁾ haben auch mit der E.D., nach *Pauli* allerdings, die Isolierung des hämolytischen Ambozeptors erzielt. Ich habe auch vor kurzem durch E.D. verschiedene Antikörper konzentriert¹⁾.

In der allerletzten Zeit haben *Bechhold* u. *Rosenberg*⁵⁾ als Reinigungsmethode für Kolloide eine Kombination von Ultrafiltration mit der E.D. veröffentlicht, die sie als Elektroultrafiltration bezeichnen. Für die Antikörperisolierung des Hämolysins wurde das Verfahren von *Laubenheimer* u. *Vollmar*²⁹⁾ zur Verwendung gebracht.

Die biologische Methode. Eine Reihe von Untersuchungen hat die Reindarstellung des Antikörpers aus einer Antigen-Antikörper-Bindung, die als von reversibel erkannt wurde, angestrebt. Die ersten hierhingehörigen Versuche haben schon 1900 *Hahn* u. *Trommsdorf*²⁰⁾ beschrieben. Sie konnten mittels schwacher Lauge oder Säure einen Teil der Agglutinine des Typhus- und Choleraserums aus den sensibilisierten Bazillen wieder frei lassen. *Landsteiner* u. *Jagic*³¹⁾ haben dann durch Extraktion mit Kochsalzlösung bei 45°C die Hämagoagglutinine des Rinderserums weiter gereinigt. Als Versuchsmaterial werden später meistens das Pneumokokken und sein Antiserum benutzt. *Weinstein*⁵⁰⁾ behandelte mit schwachem Alkali das Präzipitat von Typhusserum und Typhusbazillenextrakt und fand im Extrakt des Präzipitates Agglutinine, komplementbindende und bakterizide Antikörper. Ebenso konnten *Hurska* u.

*Pfenniger*²³⁾ aus agglutinierten Paratyphusbazillen B durch Digestion in Sacchrose-, Laktose- oder Glukosemedium bis 25% der Agglutinine wieder frei lassen und *Huntoon*²²⁾ stellt mit seinem Mitarbeiter in dest. Wasser die systematische Isolierung mit dem Antipneumokokkenserum aus Antigen-Antikörper-Bindung dar. *Ramon*⁴⁰⁾ hat auf der Grundlage seiner Flokkulationsreaktion auch die Reindarstellung des Diphtherieantitoxins aus den Niederschlägen mit Erfolg in Angriff genommen. *Kosakai*²⁷⁾ hat als erster das Hämolyisin mit Rohrzuckermedium frei gelassen. *Ogata*³⁶⁾ hat die Bakterienagglutinine und *Furuhata*²⁴⁾ hat die Hämogglutinine im Rohrzuckermedium unter Einwirkung von Natronlauge aus der Antigen-Antikörper-Bindung isoliert. Später ist *Kageyama*²⁶⁾ in unserem Institut die Isolierung des *Forssmanschen* Antikörpers, und im letzten Jahre *Sunouti*⁴⁵⁾ die des Serumpräzipitins gelungen. Die Isolierung des Präzipitins war bis dahin nicht erzielt worden. In gleicher Weise hatte *Haķu*²¹⁾ in dest. Wasser mit Bakterienpräzipitinen, Agglutininen, Bakteriolyisinen und komplementbindenden Antikörpern mit der Isolierung jedes Antikörpers Erfolg gehabt und die Identität der einzelnen Antikörper bewiesen.

Die kombinierte Methode. Zur Darstellung eines gereinigten Antirizins aus Kaninchenimmenserum verwendete *Jacoby*²⁵⁾ eine Kombination von Aussalzung und Verdauung. Das durch Ammoniumsulfatfraktionierung gewonnene, gelöste Antirizin wurde 7 Tage lang bei 37°C der Wirkung einer ebenfalls durch Aussalzung gereinigten Trypsinlösung überlassen, dann wieder durch Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt, wodurch ein wirksames Präparat entstand, das nur einen kleinen Teil der Serumkolloide enthielt. In gleicher Weise haben *Pröscher*³⁹⁾, sowie *Pick*³⁸⁾ versucht, aus dem durch Ammoniumsulfatfraktionierung isolierten Pseudoglobulin des Diphtherieserums das Antitoxin durch Trypsinverdauung rein zu gewinnen. Eine kombinierte Methode verwandten auch *Liebermann* u. *Fenyvessy*³³⁾ zur Isolierung der Hämolyisine und Hämogglutine, indem sie aus den mit Immunkörpern beladenen Blutkörperchenaufschwemmungen durch Behandlung mit Salzsäure die beiden Körper frei brachten und sie dann durch wiederholtes Neutralisieren und Ausschütteln mit Äther noch mehr reinigten.

Ich habe auch durch E.D. aus Antigen-Antikörper-Bindung die Isolierung des Immunstoffes dargestellt. Die vorausgehenden Erfahrungen der E.D. mit Immunsera geben mir bei diesem Versuch eine Grundlage.

Das Verfahren der E.D. zur Isolierung des Immunkörpers wird mit dem von mir modifizierten *Paulschen* Apparat ausgeführt. Dieser besteht aus einem runden Gefäß, in welchem Mikrozellen aus reinem Glas enthalten sind, die durch Einlage von vier Diaphragmen in 5 Räume geteilt werden. Die zwei äußeren Räume dienen zur Aufnahme der Platinnetzelektroden. Das der Anode zunächst gelegene Diaphragma hat positives, und das an der Kathode liegende negatives, elektrisches Potential. Die von diesen beiden Diaphragmen begrenzte Mittelkammer wird durch zwei Diaphragmen (harte Filterpapiere), die zwischen den Mikrozellen eingeschaltet sind, in drei Räume geteilt, nämlich in den anodischen, den zentralen und den kathodischen Mittelraum (Abb. 1 und Photo.).

Der zentrale Mittelraum wurde mit 2 cc von der mit verschiedenen Medien verdünnten Antigen-Antikörper-Bindung und die beiden Mittelräume wurden mit 3 cc dest. Wasser angefüllt, und in den äußeren beiden Räumen wurde dest. Wasser zu- und abgeführt. Den elektrischen Strom entnahm ich direkt einer Gleichstromleitung von 100 Volt Spannung.

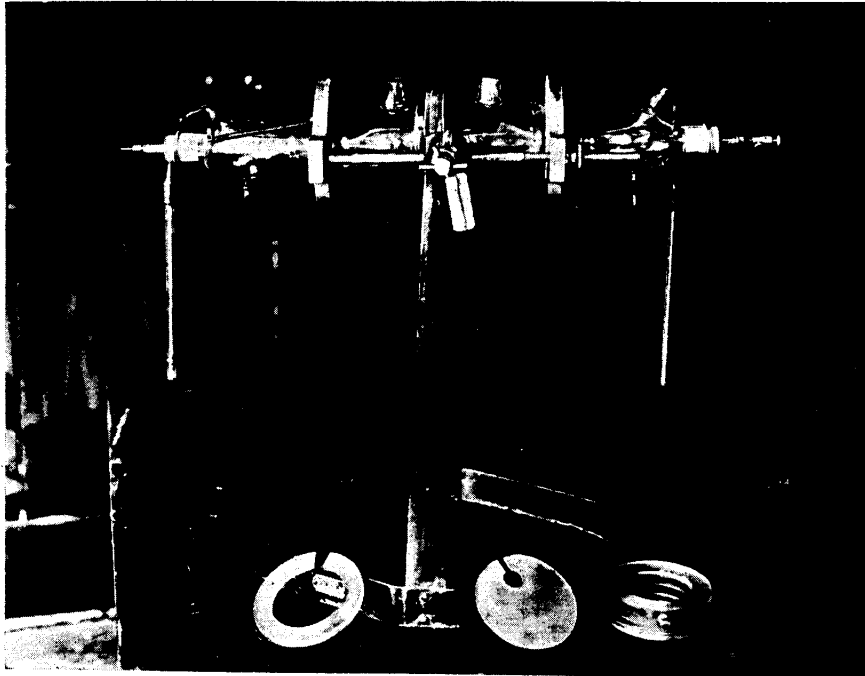
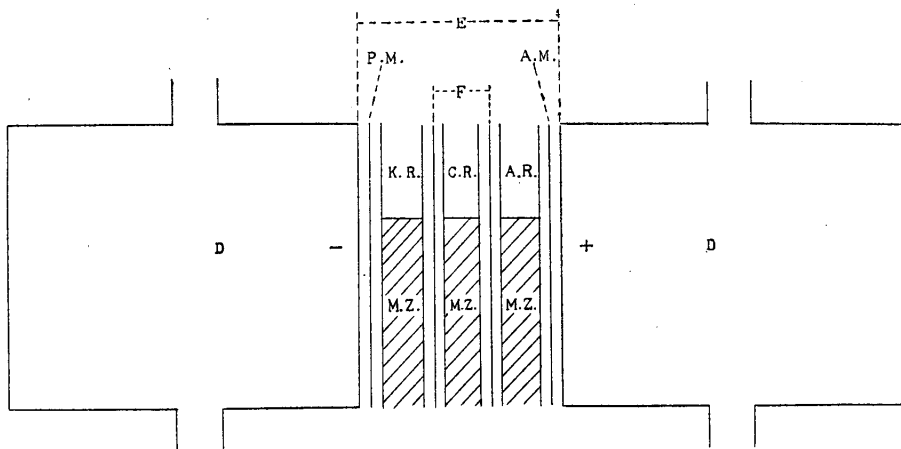


Abb. 1.
Apparat der M.E.D.I.



K.R. = Kathodischer Mittelraum.
A.R. = Anodischer Mittelraum.
P.M. = Pergamentmembrane.
E. = Elektrode (Platinnetz).
M.Z. = Mikrozelle.

C.R. = Zentraler Mittelraum.
F. = Hartes Filterpapier.
A.M. = Eieralbuminmembrane.
D. = Destilliertes Wasser.

Ich immunisierte jeden 4 Tage dreimal das Kaninchen mit 0.5 cc Rinderserum intravenös und wiederholte nach zweiwöchiger Pause die Immunisierung mehrmals.

Der Titer des Präzipitins wurde am 7. Tage nach der letzten Injektion mittels Verdünnungsmethode bestimmt. Es ist für meine Isolierzwecke nötig, daß der Verdünnungstiter des Immuserums nach der *Ogataschen* Methode mindestens über 1 : 1,000 beträgt.

Antigen-Antikörper-Komplex wird folgendermaßen hergestellt; 2 cc der 1%igen Rinderserum-Kochsalzlösung wurden mit 2 cc Immuserum versetzt, worauf das Gemisch stark geschüttelt wurde. Dann wurde es 2 Stunden lang bei 37°C in Brutofen digeriert und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Die dabei sich ergebenden Niederschläge wurden durch starke Zentrifugierung am Boden des Gefäßes abgelagert. Dann wurde der Abguß in einem Probierglas vorsichtig abpipettiert, um die übrigbleibenden Präzipitine zu prüfen. Nach Absaugen des Abgusses wurde der Bodensatz mindestens 3 mal mit Kochsalzlösung durch Zentrifugierung gut gewaschen. Die Niederschläge wurden dann mit verschiedenen Medien bis zur Ausgangskonzentration verdünnt.

Der Eiweißgehalt jeder Lösung wurde mit Ferrozyankalium-Essigsäureprobe in den Serumwert umgerechnet und der pH-Wert wurde elektrometrisch in der Hydrochinonelektrode bestimmt.

Experiment.

Nach der Isolierung mittels Mikroelektrodialyse (M.E.D.I.) im dest. Wassermedium findet man, wie Tabelle 3 zeigt, die Immunkörper nach 1 Stunde im kathodischen Mittelraum ohne nennenswerte Temperatursteigerung, dagegen nicht im anodischen Mittelraum. So kann man annehmen, daß der Immunstoff von Antigen-Antikörper-Komplex durch M.E.D.I., ebenso wie bei der biologischen Methode in höher Temperatur (60°C), sicher isoliert wird. Um diese interessante Tatsache weiter zu bekräftigen, stellte ich als Kontrolle Vergleichsversuche an.

Wie Tabelle 3 zeigt, schließt man unter den gleichen Bedingungen wie den obigen den elektrischen Strom nicht, so findet man in keiner Kammer Immunstoff, wenn auch der Komplex über 2 Stunden lang aufbewahrt wird (Tabelle 3). Im Filtrat des Antigen-Antikörper-Komplexes, welches durch hartes Filterpapier abfiltriert wird, ist der Immunkörper auch nicht nachweisbar.

Aus den Versuchen kann man sicher feststellen, daß durch M.E.D.I. der Immunstoff in den kathodischen Raum übergeht. Weiter versuchte ich die Isolierung in anderen Medien. Aber im Medium des dest. Wassers sowie der hypertonischen Kochsalzlösung (8.5%) wird kein Immunkörper in den drei Räumen nachgewiesen, wenn die Temperatur dabei auch in der Mittelkammer sich mehr erhöht als beim vorhergehenden Versuch. Aus diesem Resultate kann man schließen, daß im Kochsalzmedium durch M.E.D.I. kein Antikörper aus dem Komplex freigelassen wird, während das beim dest. Wasser-

Tabelle 3.
Vor der M.E.D.I.

	Präzipitintiter.	
	B.Z.	V.T.
Original	500	1000
Abguß	500	250
Waschwasser	500	0

A.

Nach der M.E.D.I. bei dem dest. Wassermedium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	4	0	0
Eiweißgehalt	1/500	—	1/500
pH	6.4	—	4.8
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	17°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

B.

Vergleichsversuche. Ohne elektrischen Strom.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	0	0	0
Eiweißgehalt	1/500	—	1/500
pH	6.4	6.4	6.4
Temperatur	—	17°C	—
Dauer der E.D.		2 Stunden	

B.Z. = Bindungszone. V.T. = Verdünnungstiter nach *Ogata*. K.M.R. = Kathodischer Mittelraum. C.M.R. = Zentraler Mittelraum. A.M.R. = Anodischer Mittelraum. M.E.D.I. = Mikroelektrodialyseisolierung. Eine Bruchzahl des Eiweißgehaltes ist gegen originales Serum. E.D. = Elektrodialyse.

medium der Fall war (Tabelle 4). *Kosaka*²⁷⁾ untersuchte schon den Einfluß der Elektrolyte auf die Isolierung des Immunkörpers mit der Schüttelungsmethode bei höher Temperatur. Hierauf untersuchte ich weiter den Einfluß des Kochsalzes auf den Komplex bei M.E.D.I..

Wenn man das Präzipitat von Anfang an mit dest. Wasser mehrmals wäscht und im dest. Wassermedium zur M.E.D.I. bringt, so findet man keinen Immunkörper in irgend einem Raum. Setzt man dagegen diesem Antigen-Antikörper-Komplex einige Tropfen physiologischer Kochsalzlösung zu, welches beim dest. Wassermedium

Tabelle 4.
Nach der M.E.D.I. bei dem 0.85%igen NaCl-Medium

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	0	0	0
Eiweißgehalt	1/500	—	1/500
pH	—7.0	6.4	3.7
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	20°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

Nach der M.E.D.I. bei dem 8.5%igen NaCl-Medium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	0	0	0
Eiweißgehalt	1/500	—	1/500
pH	—10.0	6.4	1.9
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	27°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

durch M.E.D.I. nicht isoliert wird, so wird der Immunstoff wieder im kathodischen Raum nachgewiesen (Tabelle 5).

Dann führte ich auf umgekehrte Weise die Versuche der M.E.D.I. mit Immunkörper aus. Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde so

Tabelle 5.
Vor der M.E.D.I.

	Präzipitintiter.	
	B.Z.	V.T.
Original	500	1000
Abguß	500	250
Waschwasser	500	0

A.

Nach der M.E.D.I. bei dem dest. Wassermedium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	0	0	0
Eiweißgehalt	1/500	—	1/500
pH	6.4	5.8	4.8
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	17°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

B.

Nach der M.E.D.I. bei dem zu dest. Wasser mit vier Tropfen
0.85%ige NaCl versetzten Medium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	8	0	0
Eiweißgehalt	1/500	—	1/500
pH	5.2	4.3	3.2
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	17°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

schwach gewaschen, daß sein Waschwasser noch den Immunstoff enthielt. Von diesem Komplex wurde der Immunkörper im dest. Wassermedium natürlich isoliert und zwar befindet er sich im kathodischen Raum. Weiter wurde dieser Komplex, welcher nur ungenügend gewaschen war, 24 Stunden lang im dest. Wasser durch einen Kollodiumsack einfach dialysiert. Bei diesem dialysierten Komplex wird der Immunstoff im anodischen oder im kathodischen Raum durch M.E.D.I. nicht isoliert, sondern bleibt im zentralen Raum wie vorher (Tabelle 6).

Aus den Untersuchungen kann man feststellen, daß Kochsalz in der M.E.D.I. des Immunkörpers aus dem Komplex eine große Rolle spielt und daß die Elektrolyte von der M.E.D.I. sehr abhängig sind.

Tabelle 6.
Vor der M.E.D.I.

	Präzipitintiter.	
	B.Z.	V.T.
Original	1000	1000
Abguß	1000	500
Waschwasser	1000	4

A.

Nach der M.E.D.I. bei dem dest. Wassermedium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	16	0	0
Eiweißgehalt	1/500	—	1/500
pH	5.9	5.5	3.7
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	17°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

B.

Nach der M.E.D.I. bei dem mit Kollodiumsack dialysierten Medium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	0	4	0
Eiweißgehalt	1/500	—	1/500
pH	6.7	6.7	6.1
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	17°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

Zum zwecke der Isolierung mit M.E.D. wirkt eine Spur von Kochsalz immer befördernd, während ein Übermaß davon hemmend wirkt.

Aus diesen Versuchen habe ich nun die Anschauung gewonnen, daß das Immuserum auch im kathodischen Raum durch die M.E.D.I. nur in einem sehr dünnen Salzmedium isoliert wird. Deshalb habe ich die folgenden Versuche angestellt.

Bei der M.E.D.I. mit Antiserum finden sich die Immunstoffe sowohl im kathodischen als auch im anodischen Mittelraum. Dagegen finden sich bei dem gleichen mit Kollodiumsack 24 Stunden lang im dest. Wasser dialysierten Antiserum die Immunstoffe nicht im kathodischen Mittelraum (Tabelle 7). Ich konnte auch bei dem Antigen-Antikörper-Komplex die Isolierung des Immunkörpers durch die M.E.D.I. darstellen und feststellen, daß die Elektrolyte bei der

Tabelle 7.
Vor der M.E.D.I.

	Präzipitintiter.	
	B.Z.	V.T.
Original	250	500

A.

Nach der M.E.D.I. des nicht behandelten Antiserums.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	32	—	32
Eiweißgehalt	1/250	—	1/250
pH	—7.5	6.4	2.7
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	20°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

B.

Nach der M.E.D.I. des mit Kollodiumsack 24 Stunden lang dialysierten Antiserums.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
Präzipitintiter.	16	—	0
Eiweißgehalt	1/250	—	1/250
pH	6.9	6.8	6.3
Ausgangstemp.	—	17°C	—
Maximaltemp.	—	17°C	—
Dauer der E.D.		1 Stunde	

M.E.D.I. eine große Rolle spielten, daher machte ich weitere Untersuchungen, um zu sehen, ob dies Verhältnis auch bei der reinen Kolloidreaktion gilt. Eine 1/100%ige positiv geladene Janusgrünlösung wurde mit gleichem Volumen einer 1/200%iger negativ geladener Kongorotlösung gemischt. Dabei wurde eine deutliche Ausflockung im Gemisch gebildet. Dann wurde der Niederschlag aus dem Abguß durch Zentrifugierung abgetrennt. Der dabei sich ergebende Niederschlag wurde mit dest. Wasser oder mit physiologischer Kochsalzlösung nach Waschen durch Zentrifugierung zur Ausgangskonzentration verdünnt.

Zur Isolierung einer Janusgrün-Kongorot-Bindung, zu der einige Tropfen physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt werden, beträgt die nötige Zeit für die Isolierung über 1 Stunde, in der die beiden Farbstoffe wieder aus der Bindung voneinander befreit werden. Dagegen beträgt beim dest. Wassermedium die benötigte Zeit nur 15 Minuten. Deswegen kann man sagen, daß die Elektrolyte in der M.E.D.I. bei der reinen Kolloidreaktion eine große Rolle spielen, ganz wie bei der Isolierung des Immunkörpers. Aber bei der Kolloidreaktion ist das Verhältnis etwas anders als bei der Immunkörperisolierung. Bei der Janusgrün-Kongorot-Bindung wirkt nämlich eine Spur Salz hemmend auf die Isolierung, jedoch ist bei der Immunkörperisolierung das Gegenteil der Fall (Tabelle 8).

Tabelle 8.

A.

Nach der M.E.D.I. des Janusgrün-Kongorotgemisches bei dem zu 2 cc dest. Wasser mit vier Tropfen 0.85% NaCl versetzten Medium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
pH	6.2	—	5.1
Dauer der E.D.		1 Stunde	

B.

Nach der M.E.D.I. des Janusgrün-Kongorotgemisches
bei dem dest. Wassermedium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
pH	6.8	—	5.6
Dauer der E.D.		15 Minuten	

Weiter untersuchte ich die Kataphorese einer 1/100%igen Janusgrünlösung. Bei physiologischer Kochsalzlösung beträgt die benötigte Zeit, während welcher Janusgrün sich zur Kathode bewegt, 30 Minuten. Dagegen beträgt beim dest. Wasser die benötigte Zeit 2. 1/3 Minuten. Bei der Janusgrünlösung wirkt Kochsalz auch hemmend auf die Kataphorese ein, wie bei der Isolierung der Janusgrün-Kongorot-Bindung (Tabelle 9).

Tabelle 9.

A.

Nach der M.E.D.I. der Janusgrünlösung
bei dem dest. Wassermedium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
pH	6.3	—	6.3
Dauer der E.D.		2, 1/3 Minuten	

B.

Nach der M.E.D.I. der Janusgrünlösung
bei dem 0.85% NaCl Medium.

	K.M.R.	C.M.R.	A.M.R.
pH	3.1	—	1.9
Dauer der E.D.		30 Minuten	

Schlufworte.

Viele Autoren studierten die Ladung des Antigens und Antikörpers bei Agglutinin und bei der *Wassermannschen* Reaktion u.a., aber man findet keine Angabe über Präzipitin, weil die Untersuchung der Ladung beim Präzipitin viel schwieriger ist als beim Agglutinin. Die Versuche der Isolierung aus dem Antigen-Antikörper-Komplex durch die M.E.D.I. führten zu interessanten Problemen, welche sich mit der Ladung des Immunstoffes, d.h. des Präzipitins, beschäftigen. Deshalb will ich etwas über dieses Problem hinzufügen.

Die ursprünglich nur von wenigen vertretene Anschauung, daß die Immunkörper Kolloide sind und daß in ihren Reaktion die allgemeine Gesetzmäßigkeit der Kolloidreaktion wiederkehrt, hat in den letzten Jahren allmählich auch in einem großen Kreise Anerkennung gefunden.

Für die Charakterisierung der Kolloide ist ihr elektrischer Zustand von großer Bedeutung. Man kann denselben durch die Richtung der Wanderung im elektrischen Felde erkennen. Elektronegative Kolloide werden zum positiven, elektropositive zum negativen Pole transportiert, während reines Eiweiß im elektrischen Felde nicht leicht nachweisbar bewegt wird. Kann man ihm durch eine Spur Säure oder Lauge eine elektrische Ladung erteilen, so wandert es zum negativen oder positiven Pole. Solche Substanzen, die je nach den Umständen eine verschiedene elektrische Ladung besitzen können, kann man als amphotere Kolloide bezeichnen. Da die Wechselwirkung von Kolloiden von der Möglichkeit einer gegenseitigen elektrischen Neutralisierung wesentlich bestimmt wird, so ist die Feststellung des elektrischen Verhaltens von Immunsstoffen für die Beurteilung ihrer Reaktion von großem Werte.

Schon im Jahre 1904 hat Römer¹⁴⁾ Überführungsversuche mit Tetanustoxin und -antitoxin angestellt, die aber keine eindeutigen Resultate geben, da die Prüfungsflüssigkeiten offenbar an den Elektroden geschädigt bzw. verändert wurden. Später veröffentlichten Field u. Teague¹⁴⁾ eine Arbeit über die elektrische Ladung von Toxin und Antitoxin und schloßen folgendermaßen: Wenn die Kombination von Toxin mit Antitoxin eine wahre chemische Reaktion wäre, so müßte man erwarten, daß unter dem Einfluß des elektrischen Stromes das Toxin nach der einen Seite, das Antitoxin aber nach der entgegengesetzten Seite wanderte. Das war aber nicht der Fall und sie glaubten daher, daß diese Verbindung keine wahre chemische Reaktion, sondern eine Adsorption darstellt. Im Schlußsatz sagen die Autoren dann noch einmal: Die Kombination von Toxin und Antitoxin scheint keine wahre chemische Reaktion darzustellen, sondern die Adsorption eines Kolloids durch ein anderes. Bechhold¹⁴⁾ stellte fest, daß der Toxinüberschuß nach der Kathode im Toxin-Antitoxinmisch wandert, besonders wenn die Überführung sofort nach der Mischung erfolgt. Landsteiner u. Pauli³²⁾ benutzten bei ihren Versuchen ein U-Rohr und stellten fest, daß Abrin, Rizin und Agglutinin der normalen Hühnersera positiv in einer sauren und negativ in einer alkalischen Lösung sind.

Ich studierte also bei der Isolierung des Immunstoffes aus Antigen-Antikörper-Komplex durch die M.E.D.I. die Ladung des Präzipitins und erhielt das obige interessante Ergebnis. Aus den Ergebnis-

sen meiner Versuche, welche bei der M.E.D.I. die Ladung des Präzipitins aus dem Komplex zum Gegenstand hatten, kann man die Bestätigung finden, daß der Immunstoff des Präzipitins sich bei einer Spur Kochsalz zur Kathode bewegt.

Zusammenfassung.

1. Es ist möglich das Serum in geringer Menge durch den von mir modifizierten *Paulischen* Apparat zu mikroelektrodialysieren.
2. Die Immunkörper werden sicher vom Antigen-Antikörper-Komplex durch M.E.D.I. isoliert.
3. Das Präzipitin wird bei einer Spur Kochsalz durch die M.E.D.I. isoliert und zwar findet es sich im kathodischen Raum.
4. Kochsalz spielt bei der Isolierung des Immunstoffes durch M.E.D. eine große Rolle. Es wird dabei immer eine Spur Kochsalz benötigt, doch wirkt eine große Menge Kochsalz umgekehrt hemmend auf die Isolierung.
5. Bei der M.E.D.I. der Janusgrün-Kongorot-Bindung wirkt jedoch das Kochsalz immer hemmend auf die Isolierung ein.
6. In dieser Weise wirkt das Kochsalz auch hemmend auf die Kataphorese der Janusgrünlösung.

Diese Untersuchung wurde von mir unter der wertvollen Leitung und liebenswürdigen Unterstützung von Herrn Prof. *M. Ogata* ausgeführt, dem ich hiermit für alle Hilfe und für freundliche Ratschläge herzlich danke.

Literatur.

- ¹ *T. Asaba*, Arb. aus d. Med. Fakultät Okayama Bd. 3, S. 314 u. 468, 1932. — ² *Beth* u. *Toropoff*, Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 88, S. 869, 1914 u. Bd. 89, S. 597, 1915. — ³ *Belfanti* u. *Carbone*, Ars. per le scin. med. Bd. 22, 1897, zit. n. Handbuch d. path. Mikr. Von *Kolle*, *Kraus* u. *Uhlenhuth* Bd. 2, S. 203, 1929. — ⁴ *Bechhold*, Die Kolloide in Biol. u. Med. 1919 u. Münch. med. Wschr. S. 1921, 1907. — ⁵ *Bechhold* u. *Rosenberg*, Biochem. Zeitschr. Bd. 157, S. 85, 1925. — ⁶ *Brunner* u. *Pinkus*, ebenda Bd. 5, S. 381, 1907. — ⁷ *Diudonné*, Arb. Kais. Ges. A. Bd. 13 zit. n. Handbuch d. path. Mikr. Von *Kolle*, *Kraus* u. *Uhlenhuth* Bd. 2, S. 203, 1929. — ⁸ *Ettisch*, Biochem. Zeitschr. Bd. 171, S. 464, 1926. — ⁹ *Ettisch* u. *Beck*, ebenda Bd. 171, S. 441, 1926. — ¹⁰ *Ettisch* u. *Ewig*, ebenda Bd. 195, S. 175, 1928 u. Bd. 200, S. 250, 1928. — ¹¹ *Ettisch* u. *Runge*, Kolloid-Zeitschr. Bd. 33, S. 26, 1925. — ¹² *Ettisch* u. *Sachsse*, Biochem. Zeitschr. Bd. 230, S. 129, 1931. — ¹³ *Freund* u. *Sernberg*, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 31, S. 429, 1899. — ¹⁴ *Field* u. *Teague*, J. of exp. med. Vol. 9, p. 86 and 225, 1907. — ¹⁵ *Giemsa* u. *Godoy*, Memor. do. Inst. Osw. Cruz, Rio de Janeiro Bd. 1, S. 18, zit. n. Handbuch d. path.

Mikr. Von Kolle, Kraus u. Uhlenhuth Bd. 2, S. 203, 1929. — 16 *Gay* u. *Chickling*, J. of exp. med. Bd. 21, p. 389, 1915. — 17 *Höber*, Phys. Chem. d. Zell u. d. Gewebe 6. Aufl., zit. n. Biochem. Zeitschr. Bd. 195, S. 175, 1928. — 18 *Hirschfeld* u. *Klinger*, Biochem. Zeitschr. Bd. 83, S. 228, 1917. — 19 *Henseval*, Compt. r. Soc. Biol. T. 82, p. 907, 1919. — 20 *Hahn* u. *Trommsdorf*, Münch. med. Wschr. S. 413, 1900. — 21 *Haku*, Arb. aus d. Med. Fakultät Okayama Bd. 1, S. 246, 1929. — 22 *Huntoon* u. *Etris*, J. of imm. Vol. 6, p. 123 u. 185, 1921. — 23 *Hurska* u. *Pfenniger*, Compt. r. Soc. Biol. T. 83, p. 1265, 1920. — 24 *Furuhata*, Jap. med. world No. 6, p. 1, 1921. — 25 *Jacoby*, Hofmeister Beiträge z. Chem. u. Path. Bd. 1, S. 51, 1902. — 26 *Kageyama*, Okayama Igakukai Zassi Nr. 43, S. 684, 1926. — 27 *Kosakai*, J. of imm. Vol. 3, p. 109, 1918. — 28 *Loek* u. *Hirsch*, J. of imm. Vol. 35, p. 519, 1924. — 29 *Laubenheimer* u. *Vollmar*, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 106, S. 202, 1925. — 30 *Landsteiner*, Wien. klin. Wschr. S. 1623, 1909. — 31 *Landsteiner* u. *Jagic*, Münch. med. Wschr. S. 764, 1903. — 32 *Landsteiner* u. *Pauli*, Wien. med. Wschr. S. 1010, 1908. — 33 *Liebermann* u. *Fenyvessy*, Centbl. f. Bakt. Bd. 47, S. 274, 1908. — 34 *Michaelis* u. *Grineff*, Biochem. Zeitschr. Bd. 41, S. 373, 1912. — 35 *Michaelis* u. *Rona*, ebenda Bd. 97, S. 57, 1919. — 36 *Ogata*, Kongreßberichte d. hyg., mikrobil u. paras. Generalversammlung 1927 u. Zeitschr. f. Immunit. Bd. 39, S. 270, 1924. — 37 *Pauli*, Biochem. Zeitschr. Bd. 152, S. 355 u. 360, 1924 u. Kolloidchemie der Eiweißkörper 1920. — 38 *Pick*, Hofmeister Beiträge z. Chem. u. Path. Bd. 1, S. 351, 1902. — 39 *Pröscher*, Münch. med. Wschr. S. 1176, 1902. — 40 *Ramon*, Compt. r. Soc. Biol. T. 88, p. 167, 1923. — 41 *Römer*, Berl. klin. Wschr. S. 209, 1904. — 42 *Ruppel* u. *Mitarbeiter*, Zeitschr. f. Hyg. Bd. 97, S. 188, 1923. — 43 *R. Stern*, Biochem. Zeitschr. Bd. 144, S. 115, 1923. — 44 *Schryver*, Zeitschr. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide Bd. 8, S. 233, 1911. — 45 *Sunouti*, Igaku Tyuo-Zassi Bd. 26, S. 1, 1928 (Japanisch). — 46 *Tizzoni* u. *Cattani*, Centbl. f. Bakt. Bd. 9, S. 189, 1891 u. Bd. 10, S. 33, 1891. — 47 *Widal* u. *Sicard*, Ann. de l'Inst. Past. T. 11, p. 353, 1897. — 48 *Wernicke*, Compt. r. Soc. Biol. T. 87, p. 1041, 1922. — 49 *Wernicke* u. *Modern*, Rev. d. l. Soc. de Biol. T. 2, p. 16, 1926. — 50 *Weinstein*, J. of imm. Vol. 3, p. 17, 1918.