

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 287—290, Mai 1969

Eine Mikro-Methode zur schnellen quantitativen Bestimmung von präzipitierenden Antikörpern im Serum

Von R. AVERDUNK und V. BUSSE

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Freien Universität Berlin, Klinikum Steglitz

(Eingegangen am 23. Januar 1969)

Es wird eine Methode zur schnellen quantitativen Bestimmung von präzipitierenden Antikörpern beschrieben. Die Äquivalenzzone wird dabei über Trübungsmessungen bei 436 nm, die Antikörpermenge bei 278 nm bestimmt. Antikörper lassen sich so in kurzer Zeit mit 0,7 ml Serum und einer Genauigkeit von $\pm 3\%$ bestimmen.

A micromethod for the rapid quantitative determination of precipitating antibodies in serum

A method is described for the rapid quantitative measurement of antibodies. The equivalence zone is determined by the measurement of turbidity at 436 nm, and the quantity of antibody is determined from the absorption at 278 nm. Antibodies can be determined rapidly in 0.7 ml. serum with an accuracy of $\pm 3\%$.

Die quantitative Bestimmung von präzipitierenden Antikörpern ist für zahlreiche biochemische, immunologische und klinisch-chemische Untersuchungsmethoden notwendig (1, 2, 3, 4, 5). Es wurde ein Verfahren erarbeitet, das schnell, ohne großen apparativen Aufwand und mit geringen Serumengen durchgeführt werden kann: Die Äquivalenzzone wird durch Trübungsmessungen bestimmt (3) und die durch die Präzipitation bedingte Abnahme des Proteins um die Antikörpermenge mit dem Spektralphotometer bei 278 nm gemessen.

Material und Methoden

Immunisierung

Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2,5 bis 3,5 kg wurden mit Human-Serum Albumin (Behring-Werke) oder Vollserum in FREUNDSchem Adjuvans immunisiert. Mit der ersten Injektion wurden 30 mg Protein gegeben. Nach drei Wochen erfolgte eine zweite Injektion mit 20 mg Eiweiß. 14 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere in Evipanarkose entblutet.

Antikaninchen- γ -Globulin vom *Hammel* wurde, wie früher beschrieben, durch Injektionen von Kaninchen- γ -Globulin in FREUNDSchem Adjuvans gewonnen (6). Das Kaninchen- γ -Globulin wurde durch zweimaliges Fällen mit Ammoniumsulfat und Trennung an Sephadex G 25 und DEAE Sephadex A 50 präpariert (6, 5).

Photometrische Messungen

wurden mit dem Photometer Eppendorf 1100M durchgeführt und falls erforderlich mit dem Kompensationsschreiber 4412 kontinuierlich registriert. Die Trübung wurde bei einer Wellenlänge von 436 nm in Mikroküvetten, das Streulicht bei der gleichen Wellenlänge in 0,5 cm-Küvetten gemessen. Die Reaktionstemperatur in Durchlaufküvetten betrug 25°, der pH-Wert 7,5, die Salzkonzentration 0,15M NaCl.

Mit Antigenmengen, die einen Proteingehalt von 33,6 μg ; 67 μg ; 100 μg ; 134,5 μg und 201 μg hatten, wurden Trübungs- und Streulichtmessungen nach 10, 15, 20 und 30 Min. durchgeführt. Der Ansatz enthielt 0,9 ml der Antiserumverdünnung (1:20), dem das Antigen in 0,1 ml-Portionen zugesetzt wurde. Zur

Beurteilung der optimalen Methode und Inkubationszeit berechneten wir die Standardabweichung S nach der Formel

$$\sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2 \right)}$$

und den Variationskoeffizienten nach der Formel

$$\frac{100 \cdot S}{\bar{X}}$$

Äquivalenzzone und Antikörper

Die Antiseren wurden im Verhältnis 1:20 mit Phosphat gepufferter (M/15 pH 7,5) 0,15M Natriumchloridlösung verdünnt. Das Antigen wurde in steigenden Mengen (0,1 ml-Portionen) der Antiserumverdünnung zugesetzt, und die Trübung nach 20 Min. gemessen. Zu 0,5 ml des 1:5 verdünnten Antiserums wurde die einem Punkt der Äquivalenzzone entsprechende Antigenmenge zugesetzt. Nach 1 Std. Inkubation bei 37° wurde das Präzipitat bei 1700 g abzentrifugiert. Der Überstand und des γ -Globulins wurde bei 278 nm in einem Spektralphotometer (Zeiss) gemessen (1). Den Eichkurven wurden Kjeldahlbestimmungen zugrunde gelegt.

Der *Antikörpergehalt* ergibt sich aus der Differenz zwischen Gesamteiweißgehalt des Serums vor der Präzipitation und dem Eiweißgehalt des 1700 g-Überstandes. Zur Kontrolle führten wir Antikörperbestimmungen im Präzipitat durch (7, 1). Hierzu wurde das Präzipitat, nachdem das Antigen und das Antiserum 1 Std. bei 37° und 16 Std. bei 4° reagiert hatten, bei 10000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat 3 mal mit Phosphat gepufferter (M/15 pH 7,5) 0,15M NaCl-Lösung bei einer Temperatur von 2° in der Kühlzentrifuge bei 10000 g gewaschen, und der Eiweißgehalt anschließend mit der Kjeldahlmethode bestimmt.

Die *Immunelektrophorese* wurde in einer LKB-Apparatur als Mikromethode durchgeführt (8): 2proz. Agarose (Fa. Difco) wurde in einer Höhe von 1,5 mm auf Objektträger gegossen. Das Probenvolumen betrug 2 μl , die Antiserummenge 70–80 μl . Die Elektrophorese (Veronalpuffer pH 8,6; $\mu = 0,1$) dauerte 60 Min. bei 9,5 Volt/cm, die Diffusionszeit 16 Std., das Auswaschen des nicht präzipitierten Proteins 24 Std. Anschließend erfolgt die Färbung der getrockneten Agarplatte mit Amidochwarz 10 B; entfärbt wurde mit Methanol/0,2N Oxalsäure (1:1, v/v).

Doppeldiffusionstest (9): Auf eine Glasplatte 4 x 11 cm wurde eine 2 mm dicke Agarschicht (1% Agar in Wasser) gegossen. In

Tab. 1

Extinktionen der Trübungs- und Streulichtmessungen in Abhängigkeit von der Zeit und Antigenmenge
0,9 ml des 1:20 verdünnten Hammelantiserums wurden mit 0,1 ml Kaninchen- γ -Globulin-Lösung (Antigen) verschiedener Proteingehalte versetzt. Die Trübungen (Tr) und Streuungen (Str) bei 436 nm mit einem Kompensationsschreiber kontinuierlich registriert und die 10, 15, 20, 30 Min.-Werte abgelesen. Den Mittelwerten liegen 10 Einzelmessungen zugrunde

Antigenmenge	E_{436} nach 10 Min.		E_{436} nach 15 Min.		E_{436} nach 20 Min.		E_{436} nach 30 Min.		
	Tr.	Str.	Tr.	Str.	Tr.	Str.	Tr.	Str.	
33,6 μ g	\bar{x}	0,0930	0,013	0,1270	0,020	0,156	0,037	0,21	0,087
	$\pm s$	0,0185	0,019	0,0214	0,024	0,020	0,030	0,02	0,050
	V	19,8900	151,260	16,8000	114,000	12,800	85,670	10,17	63,5
67 μ g	\bar{x}	0,315	0,111	0,423	0,243	0,500	0,400	0,620	0,730
	$\pm s$	0,028	0,025	0,034	0,029	0,040	0,035	0,028	0,048
	V	8,950	22,800	8,090	11,700	8,190	8,600	4,570	6,600
100 μ g	\bar{x}	0,540	0,248	0,680	0,500	0,765	0,770	0,830	—
	$\pm s$	0,0226	0,016	0,0197	0,034	0,014	0,036	0,017	—
	V	4,1900	6,560	2,9100	6,800	1,840	4,650	2,050	—
134,5 μ g	\bar{x}	0,590	0,201	0,7500	0,440	0,850	0,710	0,970	0,920
	$\pm s$	0,035	0,023	0,0280	0,038	0,022	0,052	0,018	0,035
	V	5,900	11,450	3,7500	8,520	2,620	7,250	1,980	5,100
201 μ g	\bar{x}	0,210	0,017	0,2570	0,023	0,310	0,032	0,390	0,052
	$\pm s$	0,034	0,012	0,0370	0,014	0,047	0,023	0,064	0,035
	V	16,200	69,800	14,5000	62,200	15,120	73,240	16,400	68,400
	\bar{V}	11,026	52,37	9,21	40,64	8,1	35,8	7,03	35,9

diese Schicht wurden 6 Löcher, die im Kreis um ein zentral liegendes Loch angeordnet waren, eingestanz. Der Abstand zwischen den zentralen und den peripheren Löchern betrug in der ersten Figur 0,7 cm, in der zweiten 1 cm und in der dritten 1,2 cm, der Durchmesser der einzelnen Löcher betrug 3 mm. Zum Testen auf Antigen oder Antikörper im 1700 g-Überstand wurde zu 0,5 ml des 1:5 verdünnten Antiserums das Antigen zugegeben und 1 Std. bei 37° und 16 Stdn. bei 4° inkubiert. Zum Nachweis von Antigen im Überstand wurde unverdünntes Antiserum in das zentrale Loch und der Überstand in die peripheren Löcher eingefüllt. Die Ablesung erfolgte nach 16 Stdn.

Ergebnisse

Den Mittelwerten der Tabelle 1 liegen jeweils 10 Einzelmessungen zugrunde. Die Trübung und Streuung nimmt mit der Zeit zu. Die Zunahme ist nicht linear. Es bildet sich bis zu 30 Min. kein Plateau aus. Nach 30 Min. ist eine Messung schlecht durchführbar, weil sich bis zu diesem Zeitpunkt zu große Präzipitate gebildet haben, die schnell sedimentieren und unregelmäßige Ausschläge verursachen.

Die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten liegen bei der Streulichtmessung wesentlich höher als bei der Trübungsmessung (Tab. 1). Sie liegen bei Antigenmengen um die Äquivalenzzone (100 μ g) niedriger als außerhalb dieser Zone und nehmen mit zunehmender Reaktionszeit ab. Als günstigste Zeit und Methode erwiesen sich Trübungsmessungen nach 20 Min.

Vergleichende Trübungsmessungen bei 20° und 30° ergaben eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit

Tab. 2

Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit
0,9 ml des 1:20 verdünnten Hammelantiserums wurden mit 0,1 ml Kaninchen- γ -Globulin-Lösung (Antigen) verschiedener Eiweißgehalte versetzt. Die Trübung wurde nach 20 Min. bei 20° und 30° gemessen

Antigenmenge	E_{436} bei 20°	E_{436} bei 30°	$4E_{436}$
67 μ g	0,302	0,365	0,063
100 μ g	0,830	0,916	0,086
121 μ g	0,915	1,012	0,097
134 μ g	0,970	1,022	0,052
161 μ g	0,820	0,911	0,091
188 μ g	0,407	0,446	0,039
201 μ g	0,278	0,304	0,026
			\bar{x} 0,065

mit der Temperaturerhöhung (Tab. 2). Die Extinktion nahm pro Grad um durchschnittlich 0,065 zu. Deshalb muß die Temperatur konstant gehalten werden.

Zur Ermittlung der Äquivalenzzone wurden Trübungsmessungen mit Antigenmengen entsprechend einem Eiweißgehalt zwischen 33,6 und 250 μ g bei 25° durchgeführt (Abb. 1). Die Äquivalenzzone liegt bei diesen Messungen und Hammelantiserum gegen Kaninchen- γ -Globulin zwischen 100 und 160 μ g γ -Globulin, das dem verdünnten Antiserum zugegeben wurde.

Im Doppeldiffusionstest prüften wir, ob Antigen oder Antikörper im Überstand vorlagen. Bei den Antigenmengen, die den 30, 60, 80 μ g Proteinwerten der Abb. 1 entsprechen, wurden Antikörper im 1700 g-Überstand nachgewiesen. Bei 100, 120, 140, 160 μ g traten keine Präzipitationslinien auf. Bei 180, 200, 220 μ g wurde Antigen, bei 260 μ g Antigen und Antikörper nachgewiesen.

Gleiche Verhältnisse wurden bei Kaninchenantiserum gegen Human-Serumalbumin gefunden (Tab. 3). Die Äquivalenzzone, die sehr schmal ist, wurde durch die Doppeldiffusionsteste bestätigt.

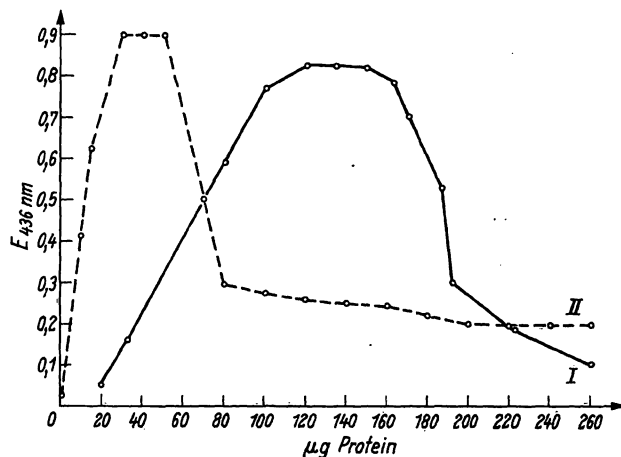


Abb. 1

Trübungsmessung zur Bestimmung der Äquivalenzzone. Zu 0,9 ml Antiserum wurden die auf der Abszisse angegebenen Proteinantigenmengen in 0,1 ml-Portionen zugegeben. Nach 20 Min. bei 25° wurde die Trübung bei 436 nm gemessen

I Hammel-Antiserum gegen Kaninchen- γ -Globulin
II Kaninchen-Antiserum gegen Humanserum

Heinzgeorg Vogelsang

Die spinale Ossovenographie

Eine diagnostische Methode

zur Erkennung pathologischer Prozesse der Wirbelsäule und des Spinalkanales

von Privatdozent Dr. med. **Heinzgeorg Vogelsang**

Leiter der Neuroradiologischen Abteilung an der Neurochirurgischen Universitätsklinik Gießen

Mit einem Geleitwort von Prof. Dr. H. W. Pia

Mit 122 Abbildungen und 11 Tabellen. Groß-Oktav. 123 Seiten. 1969. Plastik flexibel DM 42,—

Basierend auf einer verbesserten Untersuchungstechnik und systematischen Anwendung bei Erkrankungen der Wirbelsäule (Bandscheibenvorfälle, Spondylolisthesis, traumatischen Veränderungen, primären und sekundären Tumoren, Spondylosis deformans u. a.) sowie des Spinalkanales (raumfordernde Prozesse, Gefäßmißbildungen, entzündliche Veränderungen) werden die Erfahrungen niedergelegt, die der Verfasser mit der transossalen Phlebographie sammeln konnte. Grundzüge der Anatomie und Physio-

logie der Venensysteme, Methodik, Normalbefunde, Indikation und Kontraindikation, Komplikationen und Grenzen der Methode werden abgehandelt, pathologischen Befunde bei den einzelnen Krankheitsgruppen dargestellt und diskutiert. 133 Abbildungen und Tabellen veranschaulichen die Ausführungen. Vergleiche mit den üblichen Röntgenaufnahmen, myelographischen Untersuchungen und bioptischen Befunden zeigen eindrucksvoll die Leistungsfähigkeit und -breite dieser angiographischen Methode.

Walter de Gruyter & Co · Berlin 30



Praktikum
der
Physiologischen Chemie

von
Peter Siegmund
Ernst Schütte
Friedrich Körber

Oktav. XVI, 287 Seiten. Mit zahlreichen Abbildungen.
1968. DM 19,80

Es ist den Autoren gelungen, dem stark belasteten Vor-
kliniker eine praktisch verwertbare, übersichtliche und
allgemeinverständlich dargestellte Anleitung für das
Praktikum der physiologischen Chemie vorzulegen.
Auch später wird der wissenschaftlich interessierte Arzt
gerne wieder in dieses Buch hineinschauen, um bei
komplizierteren klinisch-chemischen Fragestellungen
seine biochemischen Grundkenntnisse aufzufrischen.

Fortschritte der Medizin

Dieses „Kochbuch“ enthält auch die zum Verständnis
wichtigen Skizzen, handelt es sich um die Erläuterung
des Redox-Potentials, der Titration oder um Versuchs-
anordnungen. Dankenswert auch die reichlichen Tabel-
len, die manches Nachschlagen ersparen.

Medizinstudent

Walter de Gruyter & Co · Berlin

 VERLAG
CHEMIE

*Man kann
nicht alles wissen*

*— am wenigsten alle Trivialnamen!
Wo findet man sie?
Schnell, mühelos und sicher?
In der*

Trivialnamenkartei

herausgegeben von der Redaktion
des Chemischen Zentralblattes

*und zwar jeweils den deutschen und englischen
Trivialnamen, die zugehörige Struktur- und
Summenformel sowie Hinweise auf Literatur-
stellen.*

*Die Trivialnamenkartei ist ein ideales Hilfsmittel
für jeden Chemiker. Bei dem unerlässlichen Stu-
dium von Originalliteratur z.B. leistet sie wert-
volle Dienste und spart kostbare Zeit.*

1964. 8000 Karten im Format DIN A 7. Alphabetisch
nach dem deutschen oder englischen Trivialnamen sortiert
erhältlich. Bezugspreis der Kartei DM 280,—. Die Kartei
wird in Kartonkästen geliefert. Die Serie kann auch mit
einer Bohrung zum Anbringen von Schließstangen zum
Schutz gegen Verlust einzelner Karten versehen werden
(Aufpreis DM 35,—).

1966. 1. Ergänzungslieferung. 1088 Karten. DM 60,—
(Aufpreis für Bohrung DM 6,—).

VERLAG CHEMIE · GMBH
WEINHEIM/BERGSTR.

Tab. 3

Äquivalenzpunktbestimmung eines Kaninchen-Antiserums gegen Humanalbumin

0,9 ml eines 1:20 verdünnten Kaninchen-Antiserums wurden mit 0,1 ml Human-Albumin-Lösung verschiedener Eiweißgehalte versetzt. Die Trübung wurde nach 20 Min. bei 25° gemessen. Die Äquivalenzzone liegt zwischen 40 und 60 µg Antigeneiweiß im Ansatz

µg Albumin	E ₂₇₈
10	0,20
20	0,27
30	0,31
40	0,45
50	0,45
60	0,46
70	0,39
80	0,25
90	0,05
100	0,05

Im Äquivalenzpunkt ist die Reaktionsgeschwindigkeit so hoch, daß nach 1 Std. 37° die Bildung abzentrifugierbarer Präzipitate abgeschlossen ist (Tab. 4). Die Antikörperbestimmungen aus dem 1700 g-Überstand können deshalb nach 1 Std. durchgeführt werden.

Tab. 4

Verschiedene Inkubationszeiten im Äquivalenzpunkt

Zu 0,5 ml des 1:5 verdünnten Hammelantiserums wurden 600 µg Kaninchen-γ-Globulin zugesetzt. Diese Antigenmenge entspricht einem Punkt (120 µg) der durch Trübungsmessungen (Abb. 1) ermittelten Äquivalenzzone. Das Präzipitat wurde bei 1700 g abzentrifugiert, und der Überstand nach Verdünnung (1:100) bei 278 nm photometriert. Die Präzipitatbildung ist im Äquivalenzpunkt nach 1 Std. (37°) abgeschlossen

1 Std. 37°	1 Std. 37° 3 Stdn. 20°	1 Std. 37° 3 Stdn. 20° 16 Stdn. 4°
0,082	0,080	0,081
0,070	0,068	0,070
0,072	0,070	0,070
0,072	0,068	0,076
0,076	0,075	0,075
0,070	0,068	0,068
0,068	0,068	0,068
0,074	0,072	0,072
0,074	0,073	0,074
0,072	0,072	0,070
$\bar{x} = 0,073$	0,071	0,072
$s = \pm 0,0039$	$\pm 0,004$	$\pm 0,003$

Auch beim Kaninchen-Antiserum gegen Human-Serum ergab sich eine Zone maximaler Trübung. Diese nahm bei hohen Antigenmengen jedoch nicht ab (Abb. 1_{II}). In der Immunelektrophorese (Abb. 2) wurde nachgewiesen, daß nach Zugabe von Antigenmengen, die dem Kurvenmaximum (Abb. 1_{II}) entsprechen, nur die Antikörper gegen das γ-Globulin quantitativ mit dem Antigen reagiert hatten. Die meisten anderen Antikörper waren noch nicht abgesättigt und bildeten deshalb Präzipitationslinien (Abb. 2 B). Nach Zugabe einer Antigenmenge entsprechend der Proteinmenge von 180 µg (Abb. 1_{II}) sind alle Antikörper bis auf das Anti-α₂-Globulin und ein Anti-β-Lipoprotein abgesättigt; bei 260 µg waren keine Antikörper mehr im Überstand vorhanden.

Antikörperbestimmungen

Die Extinktion des Kaninchen-Antiserums gegen Human-Albumin beträgt 0,278 (Tab. 5). Dieses entspricht einem Eiweißgehalt des Serums von 58,7 g/l. Nach Zugabe der einem Punkt der Äquivalenzzone entsprechenden Albuminmenge lag die Extinktion bei 0,214. Dies entspricht einer Menge von 47,5 g/l Eiweiß.

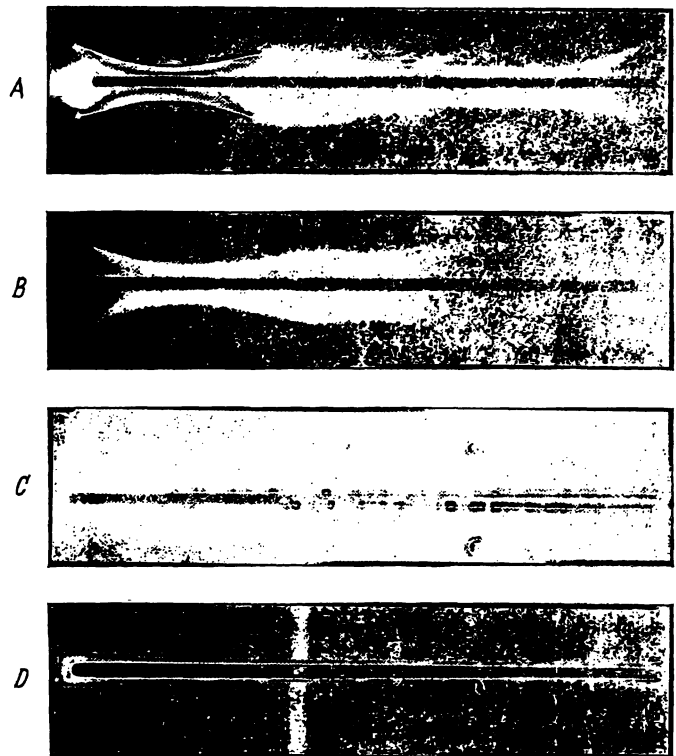


Abb. 2

Immunelektrophoresen mit unterschiedlich abgesättigtem Antihumanserum. Dem elektrophoretisch aufgetrennten Humanserum wurde

- A das 1:5 verdünnte Antiserum zugesetzt
- B das 1:5 verdünnte Antiserum mit einer Serummenge von 200 µg versetzt (entsprechend 40 µg in Kurve II, Abb. 1), 1 Std. bei 37° und 16 Stdn. bei 4° inkubiert und bei 1700 g abzentrifugiert. Das so abgesättigte Serum wurde als Antiserum verwendet
- C wie B, jedoch mit 900 µg Serum Protein abgesättigt (entsprechend 180 µg in Kurve II, Abb. 1)
- D wie B, jedoch mit 1,3 mg Serum Protein abgesättigt (entsprechend 260 µg in Kurve II, Abb. 1)

Der Antikörpergehalt des Serums gegen das Albumin beträgt also 58,7—47,5 g = 11,2 g/l.

Der Eiweißgehalt des Hammelserums betrug 98,7 g/l. Nach Zugabe des Kaninchen-γ-Globulins in einer Menge, die einem Punkt der Äquivalenzzone entsprach, wurde eine Proteinmenge von 81,5 g gemessen. Der Antikörpergehalt des Hammelserums betrug demnach 17,2 g/l.

Die Bestimmung des Antikörpergehaltes aus dem Präzipitat ergab nach dreimaligem Waschen für das Antialbuminserum 10,1 g/l Antikörperweiß, für das Hammelantiserum 16,2 g/l Antikörperweiß.

Tab. 5

Extinktionen des Vollserums und des 1700 g-Überstandes Von 10 Verdünnungen (1:100) des Kaninchen-Antiserums gegen Human-Albumin wurden die Extinktionen bei 278 nm im Spektralphotometer (Zeiss) gemessen

Zu 0,5 ml des gleichen 1:5 verdünnten Serums wurden 200 µg Albumin gegeben. Das Präzipitat wurde nach 1 Std. (37°) bei 1700 g abzentrifugiert. Die Überstände wurden 1:20 verdünnt und die Extinktionen 10 solcher Ansätze bei 278 nm gemessen

	E ₂₇₈ nm Antiserum	E ₂₇₈ nm Überstand
1.	0,278	0,210
2.	0,271	0,220
3.	0,284	0,205
4.	0,272	0,210
5.	0,279	0,213
6.	0,278	0,219
7.	0,282	0,205
8.	0,269	0,219
9.	0,285	0,212
10.	0,281	0,220
\bar{x}	0,278	0,214
s	$\pm 0,006$	$\pm 0,007$

Diskussion

Quantitative Antikörperbestimmungen werden noch vielfach mit der klassischen Methode nach HEIDELBERGER (7) oder mit anderen Methoden der Präzipitatanalyse, die in Mikromengen im Agargel (10) auf Chromatographiepapier (11, 12) oder Polyester-Streifen (13) vorgenommen werden, durchgeführt. Diese Methoden sind zwar sehr exakt, verbrauchen aber teilweise viel Serum (7) oder sind methodisch recht aufwendig und zeitraubend (11—13).

Zur Charakterisierung der Antigen-Antikörperreaktion und zur quantitativen Bestimmung von einzelnen Plasmaproteinen haben sich Trübungs- bzw. Streulichtmessungen bewährt (14, 15, 3). Auch die photometrischen Messungen von Eiweißen bei 278 nm werden häufig verwendet (6, 1, 2, 5). Trübungsmessungen haben eine relativ große Fehlerbreite, sind aber zur Bestimmung der Äquivalenzzone hinreichend genau, da diese sich über einen größeren Bereich erstreckt (Abb. 1, Tab. 3).

Vergleiche mit der klassischen Methode (7, 1), die auf der Eiweißbestimmung des Präzipitats beruht, ergeben gute Übereinstimmungen. Jedoch lagen die Werte nach den hier angegebenen Methoden durchschnittlich 10%

höher. Wurde das Präzipitat statt dreifach neunfach gewaschen, so nahm die Eiweißmenge des Präzipitats zwischen der dritten und neunten Waschung durchschnittlich um 4% pro Waschung ab. Bei den hier beschriebenen Antikörpern von Hammeln und Kaninchen gegen ein Eiweiß als Antigen tritt also ein Eiweißverlust durch die einzelnen Waschungen ein.

Ihre Grenze hat die Methode bei geringen Antikörpermengen im Serum und, wie am Vollserum gezeigt wurde, beim Vorliegen einer Vielzahl von verschiedenen Antigenen in verschiedenen Konzentrationen. Diese Einschränkung gilt aber auch für alle anderen Methoden (11, 15, 7, 1, 13).

Für die Trübungsmessungen sind 0,5 ml Serum notwendig, das nach Verdünnung für 10 Messungen ausreicht. Zur Antikörperbestimmung sind 0,2 ml erforderlich; 0,1 ml wird zur Messung der Serum-Eiweißkonzentration und 0,1 ml zur Antikörperbestimmung benötigt. Bei quantitativer Antikörperbestimmung mit extrem geringen Serumengen bei kleinen Versuchstieren, läßt sich durch Mikroküvetten (z. B. das Beckmann-Ultramikroanalytensystem (14, 4)) mit noch geringeren Serumengen auskommen. In diesen Versuchen wurden zur Trübungsmessung 0,5 cm-Küvetten benutzt.

Literatur

1. KABAT, E. A. und M. M. MAYER, *Experimental Immunochimistry*, Second Edition, C. C. Thomas Publ. Springfield (1964).
2. KWAPINSKI, J. B., *Meth. of Serological Research*, J. Wiley & Sons, New York (1965).
3. SCHULZE, H. E. und H. G. SCHWICK, *Behring-Werke Mitteil.* 35, 57 (1958).
4. SCHWICK, H. G., *Immunchemie* p. 55, Springer-Verlag, Berlin (1965).
5. VOSS, H., G. HENNEBERG, R. HERMANN, H. PICHL, S. SCHULTE-OVERBERG und H. WERNER, *Zbl. Bakt. Abt. I Orig.* 203, 249 (1967).
6. AVERDUNK, R. und K. E. GILLERT, *Zbl. Bakt. Abt. I Orig.* 207, 393 (1968).
7. HEIDELBERGER, M. und F. E. KENDALL, *J. Exper. Med.* 50, 809 (1929), *J. Exper. Med.* 62, 697 (1935).
8. SCHEIDEGGER, J. J., *Internat. Arch. Allergy* 7, 103 (1955).
9. OUCHTERLONY, Ö., *Progr. Allergy* 6, 30 (1955).
10. LIBICH, M., *Immunology* 4, 164 (1961).
11. AMBROSIUS, H., *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 18, 279 (1967).
12. STÖSS, B., *Zbl. Bakt. Abt. I Orig.* 171, 103 (1958).
13. KALLEE, E., VIth Intern. Congress clin. Chem., S. Karger Basel (1966).
14. HÖLZER, K. H. und G. BRÜGIUS, VIIth Intern. Congr. Int. Med. München 1962, Vol. II, 536 (1963).
15. GITLIN, D. und H. EDELHOCH, *J. Immunol. Baltimore* 66, 67 (1951).

Dr. R. Averdunk
1 Berlin 45
Hindenburgdamm 30