

BEITRAG ZUR DIREKTPHOTOMETRISCHEN AUSWERTUNG VON PHEROGRAMMEN AUF TROCKENFILMEN

JEAN BARROLIER

Hauptlaboratorium der Schering A.-G., Berlin-West (Deutschland)

(Eingegangen den 18. November 1959)

Das unsaubere Arbeiten mit geölten Papieren und der Wunsch höhere Grade der Lichtdurchlässigkeit zu erreichen, als die bei normalen Papieren bestenfalls erreichbaren 20 %, haben Anlass gegeben, Methoden zu entwickeln, welche die Pherogramme als durchsichtigen Trockenfilm liefern. Ein Schritt in dieser Richtung war das von uns empfohlene Imprägnieren des Papiers mit Lacken von geeignetem Brechungsindex¹, wobei trockene Filme entstehen, deren Transparenzgrad dem geölter Papiere entspricht.

Es wurden weiterhin Methoden entwickelt, welche Pherogramme als durchsichtige Filme von sehr hoher Lichtdurchlässigkeit und gleichmässigem Untergrund liefern. Dieses Ziel lässt sich prinzipiell auf 3 Wegen erreichen:

A. Die Pherogramme werden von vornherein auf durchsichtigen Medien gemacht, welche nach Färben und Trocknen unmittelbar einen durchsichtigen Film geben; z.B. Agargel, Collodiumgel, Stärkegel.

B. Es wird auf Trägern elektropheniert, welche sich nachträglich in einen durchsichtigen Film umwandeln lassen. In Frage kommen hierfür besonders Träger aus Acetylcellulose, z.B. acetylierte Papiere, Membranfolien aus Acetylcellulose.

C. Normale, gefärbte Papierpherogramme werden mittels eines elektrophoretischen Kontaktkopierverfahrens auf einen durchsichtigen Film kopiert.

Es soll hier allein die Herstellung durchsichtiger Pherogramme behandelt werden. Die eigentliche elektrophoretische Technik wird nur insoweit berührt, als sie wichtig für die Herstellung solcher Pherogramme ist.

A. Durchsichtige Medien

Agargel. Die besonders von GRABAR und Mitarbeitern² ausgebaute Elektrophorese auf Agargel wurde von GIRI³ technisch weiterentwickelt, indem er als Unterlage für das Agargel Cellophanmembranen oder Polyesterfilm verwendete; er bekam so trockene, durchsichtige Pherogramme.

Als Träger hat sich bei uns eine mit einer Klebschicht aus Chlorkautschuk versehene PVC-Folie (Handelsname: Tesafilm No. 4) sehr gut bewährt. Wir spannen diese Folie unter Einrahmen mit Leukoplastband auf eine Glasscheibe auf und giessen die heisse, pufferhaltige Agarlösung auf die Klebschicht. Das erstarrte Agargel haftet gut auf dieser Chlorkautschukschicht und wird später beim Trocknen mit dem PVC-Film fest verklebt. Der Agarfilm wird zusammen mit der Glasplatte in die Elektro-

phoreseapparatur eingesetzt; die Stromzufuhr aus den Puffertrögen erfolgt in bekannter Weise über aufgelegte Brücken aus dickem Filterpapier. Bewährt haben sich Gele mit 0.5–0.75 % Agargehalt. Zusatz von 2–5 % 1,2-Propylenglykol erhöht die Geschmeidigkeit der Gele, unterdrückt die Bildung von Rissen und auch das Auskristallisieren von Puffersalz beim Trocknen; ferner wird dem Austrocknen des Gels während der Elektrophorese entgegengewirkt.

Steigende Agar-, Puffer- und Propylenglykolkonzentrationen wirken sich in einer Verlangsamung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten bei erhöhter Zonenschärfe aus.

Zur Auftragung der Substanz legen wir eine aus einem ca. 0.5 mm dicken Glasfaden haarnadelförmig gebogene Glasspange auf das oberflächlich leicht angetrocknete Gel und lassen die Substanzlösung in die Spange einfließen, wo sie kapillar festgehalten wird. Nach einigen Minuten wird sie mit einer Pinzette vom Gel abgehoben; hakenförmiges Abbiegen eines Schenkeldes erleichtert dies. Die Lösung bleibt als scharfer Strich auf dem Gel liegen und diffundiert rasch vollständig ein.

Die gelaufenen Pherogramme werden zunächst auf der Glasplatte ausgespannt belassen und im Warmluftstrom bei ca. 35° getrocknet, wenn nötig anschliessend bei 80–90° hitzedenaturiert und dann von der Glasplatte abgenommen. Färbung in üblicher Weise; am besten aus 0.1 %iger Farbstofflösung in 95 %igem Methanol (2 % Eisessig enthaltend). Proteinpherogramme wurden gefärbt mit Amidoschwarz 10B, Neucoccin, Rubin S, Wasserblau 6B, Indigotetrasulfonat. Der Untergrund wird rasch und vollständig entfärbt.

Sollte sich die Agarschicht an einigen Stellen von der Unterlage abheben und sich etwas Flüssigkeit in einer Blase ansammeln, dann sticht man sie im Entfärbungsbad mit einer Nadel an. Der Blaseninhalt läuft aus und das Gel legt sich glatt an die Unterlage an; der Einstich ist nicht mehr sichtbar. Zum Trocknen spannt man den Film mit der Agarschicht nach aussen auf eine gewölbte Fläche, z.B. eine grosse Glasflasche auf.

Die Lichtdurchlässigkeit dieser Agarpherogramme liegt zwischen 75 und 80 %. Die Proteinzonen sind stets klar durchsichtig. Bei Veronalpuffer, pH 8.6 ist die kathodisch gerichtete Endosmose sehr gross.

Collodiumgel. Das Prinzip besteht darin, aus einer Collodiumlösung und einem geeigneten Füllmittel (1,2-Propylenglykol, 1,4-Butylenglykol) eine Giessmasse herzustellen, die beim Verdunsten des Äthers zu einem klaren Gel erstarrt. Dieses Gel wird durch Baden in Pufferlösung vom Füllmittel, sowie von Resten Alkohol und Äther befreit. Man erhält klare, sehr wasserhaltige und doch steife Gele die beim Eintrocknen völlig durchsichtige Collodiumhäute geben. Als Träger für das Gel eignen sich Folien aus Celluloid oder Acetylcellulose, auf denen das Gel und später die Collodiumhaut gut haften.

Als Giessmassen haben sich bewährt:

(1) 40 ml Collodiumlösung (4 %ig) + 40 ml Butanol + 160 ml 1,2-Propylenglykol. Ausgewässertes Gel = ca. 0.8 %ig an Trockensubstanz.

(2) 20 ml Collodiumlösung (4 %ig) + 10 ml Butanol + 200 ml 1,4-Butylenglykol. Ausgewässertes Gel = ca. 0.3–0.4 %ig an Trockensubstanz.

Die Trägerfolie wird auch hier mit Leukoplastband auf einer Glasplatte ausgespannt und die Collodiummischung 1.5–2 mm dick in den Leukoplastrahmen auf die Folie gegossen. Nach 1½–2 Stunden ist die Masse zum Gel erstarrt. Nach Auswässern in Pufferlösung ist das Gel für die Elektrophorese bereit. Sowohl das frisch gegessene als auch das pufferfeuchte Gel sind einige Zeit (ca. 8 Tage) unverändert haltbar.

Die Elektrophorese selbst geschieht in bekannter Weise, wie z.B. bei Agargel (s.o.). Flüchtige Puffer sind vorteilhaft; bei hohen Konzentrationen an nichtflüchtigen Puffern können beim Trocken Puffersalze auskristallisieren und sich nach dem Färben auf dem Film als Abdrücke markieren.

Die getrockneten Pherogrammfilme werden von der Glasplatte abgezogen und wie üblich gefärbt. Der Untergrund nimmt überhaupt keinen Farbstoff an und lässt sich daher besonders leicht farblos waschen.

(a) Proteine werden in 0.1 %igen Farbstofflösungen in 0.1 N essigsäurem 50 %igem Methanol gefärbt (z.B. Neucoccin, Rubin S). Für Amidoschwarz 10B empfiehlt sich eine 0.01 %ige Farbstofflösung.

(b) Saure Mucopolysaccharide werden aus schwach essigsäuren wässrigen Lösungen von Toluidinblau oder Brillantcresylblau angefärbt. Der Untergrund nimmt im Gegensatz zu Papier keinen Farbstoff an und wird leicht farblos gewaschen.

(c) Zur Sichtbarmachung von Aminosäuren badet man den Film 5–10 Minuten lang in einer Lösung von 300 mg Ninhydrin + 30 mg Cd-acetat in 30 ml *sec.*-Butanol und trocknet dann an der Luft. Nach kurzer Zeit setzt die Ausbildung der Rotfärbung der Aminosäuren ein.

Diese Pherogrammfilme sind völlig klar und durchsichtig. Die Lichtdurchlässigkeit liegt zwischen 84 und 88 % (400–600 m μ). Die Collodiumhaut ist trocken 5–15 μ dick.

B. Nachträglich in einen durchsichtigen Film umwandelbare Träger

Membranfolien (käuflich als "Membranfolien zur Elektrophorese"). Mit diesen aus Acetylcellulose hergestellten Folien erhält man besonders schöne Ergebnisse. Die elektrophoretische Technik entspricht vollständig der Papierelektrophorese, wobei horizontale Anordnung der Folien, z.B. in einer Apparatur nach LAURELL (sog. "Nagelbrett"), und ein Spannungsgefälle von 6–7 V/cm zu empfehlen sind. Die Pherogramme werden dann mit einem Gummirollenquetscher auf einer Glasplatte glatt aufgequetscht und bei Zimmertemperatur trocknen lassen. Auf eine Hitze-denaturierung kann bei vielen Proteinen verzichtet werden, sonst wird nur 5–10 Minuten bei 80° denaturiert. Längeres und höheres Erhitzen führt zum Kräuseln und Verziehen der Folien.

Die Färbung der von der Glasplatte herunter genommenen Folie geschieht wie bei Papierpherogrammen, wobei mit Leichtigkeit gute Anfärbungen bei völlig weissem Untergrund erhalten werden; z.B. Proteine mit den üblichen Eiweissfarbstoffen, Kohlehydrate mit der PAS-Färbung, Aminosäuren und Peptide mit Ninhydrin–Cd-acetat, saure Mucopolysaccharide mit Toluidinblau, ungesättigte Lipoide durch

Halogenaddition, Halogensilberbildung und anschliessende Reduktion zu Silber⁴, Lipoide mit Sudanfarbstoffen.

Das gefärbte Folienpherogramm wird nach dem Auswaschen des Untergrundes nass auf eine Glasplatte mit dem Gummirollenquetscher aufgewalzt und mit Eisessig besprüht. Die Folie sintert zu einer durchsichtigen Schicht zusammen. Nach dem Verdunsten des Eisessigs ist der trockene Film bereits sehr lichtdurchlässig (80–83 %), zeigt aber noch eine geringe Trübung. Durch anschliessendes Besprühen mit Phenol-Wasser-Eisessig (80:20:10) wird er schlechthin absolut durchsichtig; im Warmluftstrom bei 35–40° verdunstet das Phenol in 1½–2 Stunden. Unter Wasser löst sich der Film leicht von der Glasunterlage. Er sieht aus wie die als Verpackungsmaterial dienenden "Cellophanhäute". 1–2 Stunden zwischen Filterpapier gepresst, bleiben die Filme völlig glatt.

Die Eisessig- und Phenolbehandlung schädigt die oben genannten Färbungen nicht. Der Einschluss der Farben in die Acetylcellulosemasse ist so vollständig, dass selbst von löslichen Farbstoffen unter Wasser nichts herausgelöst wird.

Da die Acetylcellulose bei der beschriebenen Durchsichtigmachung angelöst wird, lassen sich die Membranfolien dabei leicht verschweissen. Legt man beim Aufquetschen auf die Glassplatte 2 Folien mit den Schnittkanten aneinander, so verschmelzen diese beim Sprühen mit Eisessig usw. mit einander vollständig; die Verschmelzungslinie ist kaum sichtbar. Man kann daher Pherogrammfolien der Länge nach teilen, verschiedenen Färbungen unterwerfen (z.B. auf Proteine, Kohlehydrate etc.) und nachträglich wieder zusammen schweissen. Man bekommt so sehr eindrucksvolle Bilder.

Oft zeigen Proteinzone, besonders bei höheren Konzentrationen, auf den durchsichtigen Pherogrammen neben der Färbung auch eine Trübung. Unter dem Mikroskop sieht man diskrete gefärbte Proteinpartikel in einer klaren farblosen Grundmasse. Die Trübung ist bei hohen Proteinkonzentrationen (z.B. Albuminzone der Serumpherogramme) auch im durchsichtig gemachten, ungefärbten Film sichtbar. Das Gleiche gilt auch für Acetylpapiere, die in Paraffinöl auf einen hohen Transparenzgrad (ca. 60 %) gebracht wurden; bei den an gewöhnlichen Papieren erreichbaren mässigen Transparenzgraden (ca. 14–17 %) fällt sie kaum auf. Ob und in welcher Stärke Trübungen auftreten, hängt von der Art des Proteins ab; bei klaren Proteinzone zeigt das Mikroskop nur eine homogene Färbung des Films.

Trotz solcher Trübung bleibt bei der Direktphotometrie die lineare Beziehung von Dosis und Extinktionskurvenfläche erhalten. Die Eichkurven werden lediglich steiler.

Vollacetyliertes Papier. Die Technik des Durchsichtigmachens von Membranfolien lässt sich auch auf vollacetylierte Papiere anwenden. Man erhält auf diesen Papieren sehr gute Pherogramme. Besonders lassen sich darauf Glycoproteine bei völlig weissem Untergrund darstellen, wie HÖLZER⁵ gezeigt hat. Bei Zusatz von 10 % 1,2-Propylenglykol zum Puffer benetzen sich die Acetylpapiere wie gewöhnliches Papier; es genügt auch schon dem Puffer etwas Aceton oder Alkohol zuzusetzen.

Beim Umwandeln in einen Trockenfilm muss vor allem der Einschluss von Luftblasen verhütet werden.

Das Pherogramm wird unter Evakuieren mit Anisol durchtränkt. Auf eine Glasplatte bringt man eine Flüssigkeitsschicht eines Gemisches von Phenol-Anisol-1,2-Propylenglykol (100:20:1.2) und legt das mit Anisol durchtränkte Pherogramm, *ohne es vorher abzulöschen*, auf diese Flüssigkeitsschicht. Dann giesst man weiterhin Phenol-Anisol-Propylenglykolgemisch darauf, bis das Papier vollständig damit bedeckt ist. Es wird sofort völlig durchsichtig. Dann wird wagerecht liegend im Warmluftstrom bei 35–40° getrocknet. Den Trockenfilm löst man unter Wasser von der Glasplatte ab.

Der Pherogrammfilm hat 68 % Lichtdurchlässigkeit. Unter dem Mikroskop sieht man darin noch einige Faserreste, vermutlich einige nicht völlig acetylierte Papierfasern. Daher ist der Film auch nicht glasartig klar, sondern zeigt noch eine geringe Trübung. Aus dem 0.23 mm dicken Papier Schleicher u. Schüll 2043 a, vollacetyliert, entsteht ein 0.17 mm dicker Film.

C. Kopierverfahren

Elektrokopien von Papierpherogrammen. Legt man ein feuchtes, gefärbtes Papierpherogramm auf ein alkalisches Gel, so diffundiert rasch ein grosser Teil des vom Eiweiss gebundenen Farbstoffs in das Gel; die Farbstoff-Proteinbindung wird bei $\text{pH} > 5-6$ gelöst. Der zunächst unvollständige Farbstoffübergang wird durch Anlegen eines elektrischen Spannungsgefälles in Richtung Papier-Gel vervollständigt und es entsteht im Gel ein hinsichtlich Form und Farbstoffmenge getreues Abbild des Originals. Aus dieser Beobachtung wurde ein Kopierverfahren entwickelt.

Als Kopiermaterial dient eine mit Formalin leicht angehärtete Gelatine, die auch bei alkalischem pH nicht klebrig ist. Die daraus hergestellten Filme lassen sich trocken aufbewahren und quellen beim Einweichen in Pufferlösung wieder zu einem Gel mit den gewünschten Eigenschaften.

Man stellt unter Erhitzen auf dem Wasserbad eine wässrige Lösung her, die 20 % einer harten, farblosen Gelatine und 3 % Glycerin enthält. Wir benutzten die Gelatinesorte "Smaragd" der Fa. Heinr. Rathjen, Gelatinefabrik, Nienburg/Weser. Zu 100 ml dieser heissen Lösung gibt man unter gründlichem Durchmischen 10 ml einer 0.35 %igen Formalinlösung (40 %iges Handelsformalin 1:120 mit Wasser verdünnt).

Man giesst die heisse Gelatinemischung auf eine feuchte, auf einer Glasplatte unter Einrahmen mit Leukoplastband (sog. Lassoband) aufgespannte Cellophanfolie 2–3 mm dick auf. Für eine Fläche 30 × 50 cm werden ca. 500 ml gebraucht. Nach dem Erstarren wird im Warmluftstrom bei ca. 40° getrocknet und dann der Gelatinefilm samt der fest daran haftenden Cellophanfolie in passende Stücke zurechtgeschnitten.

Man quillt diese Gelatinefilme bei Bedarf in Pufferlösung (s.u.), wobei sich gleichzeitig die Cellophanhaut ablöst, die dann verworfen wird.

Die Apparatur für die Elektrokopie besteht aus

(1) einer Gleichstromquelle. Stufenlos regelbar bis maximal 20 V; belastbar bis 1–1.5 A.

(2) 2 Elektrodenblechen, entsprechend der Grösse der zu kopierenden Papierpherogramme, z.B. 20×6 cm. Anode = 0.05 mm starkes Pd-Blech. Kathode = 1 mm starkes Silberblech.

(3) 2 Kühlplatten aus Glas; mit Wasserkühlung.

Man wendet bei der Elektrokopie einen Ammonacetatpuffer vom pH 4.0 an, bei dem die Farbstoff-Eiweissbindung noch nicht gelöst und kein Farbstoff aus den gefärbten Zonen eluiert wird. Erst das an der Kathode entwickelte Ammoniak löst den Farbstoff vom Eiweiss ab, der dann sofort elektrophoretisch in das Gelatinegel abwandert. Der Ammonacetatpuffer wird durch Zugeben von konz. Ammoniak zu 0.2 N Essigsäure bis zum pH 4.0 hergestellt. Andere Puffersalze, z.B. Na-acetat, erwiesen sich als weniger gut geeignet.

Zur Ausführung der Elektrokopie legt man in der angegebenen Reihenfolge aufeinander:

Kühlplatte; Anodenblech aus Pd; 15–20 Lagen puffergetränktes Filterpapier (ca. 7 mm); Gelatinegel (ca. 1.2–2 mm); mit Puffer besprühtes Originalpherogramm; 2 Lagen pufferfeuchtes Filterpapier; Kathodenblech aus Silber; Kühlplatte.

An die Elektrodenbleche wird eine Spannung von 10–15 V gelegt. Anfangsstromstärke = 0.8–1 A, die im Laufe des Kopierens auf etwa die Hälfte absinkt. Mit Hilfe von zwischengelegten Streifen aus dünner Pd-Folie wurden die Spannungsfälle in den einzelnen Schichten gemessen (Tabelle I).

TABELLE I

<i>Schicht</i>	<i>Dicke mm</i>	<i>Spannungs- gefälle V</i>	<i>V/cm</i>
kath. Deckblätter	0.75	2.2	29.4
Originalpherogramm	0.35	0.7	20
Gelatinegel	1.5	7.2	58
anod. Papierblock	7.1	5	7.05

Man kontrolliert den Fortgang des Kopierens, indem man nach 10 Minuten und dann in Abständen von 5 Minuten unterbricht, Kühlplatte und Kathodenblech abnimmt und das Originalpherogramm etwa zur Hälfte vom Gel abhebt, so dass es nachher wieder in die ursprüngliche Lage gebracht werden kann. Falls das Pherogramm und das aufliegende Filterpapier zu trocken erscheinen, sprüht man mit Puffer nach.

Der Farbstoff wandert in etwa 12–15 Minuten quantitativ vom Papierpherogramm in das Gelatinegel. Nach etwa 45 Minuten hat er auch das Gel durchwandert und schlägt auf den anodenseitigen Papierblock durch.

Aus den für Papier und Gel gemessenen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten (Tabelle II) errechnen sich Kopierzeiten, die den experimentell gefundenen nahe kommen; nämlich 7.5 Minuten für den quantitativen Farbstoffübergang vom Pherogramm in das Gel und 55 Minuten bis zum Durchschlagen des Farbstoffs durch das Gel.

Diese Überschlagsrechnung berücksichtigt nicht die für die kathodische Ammo-

TABELLE II

WANDERUNGSGESCHWINDIGKEITEN (mm/V/h) VON NEUCOCCIN IN 0.2 M AMMONACETAT

pH	Gelatinegel	Papier*
7.0	1.84	2.73
6.0	1.64	2.42
5.0	0.5	2.02
4.0	0.5	2.02

* Machery u. Nagel 214.

niakentwicklung und dessen Diffusion zum Pherogramm erforderliche Zeit. Ferner bleiben die im Gel herrschenden pH-Verhältnisse unberücksichtigt.

Die Kopie wird in folgender Lösung fixiert (ca. 20–30 Minuten): 84 Vol. Methanol (95 %ig) + 5 Vol. Glycerin oder 1,2-Propylenglykol + 10 Vol. Formalin (40 %ig) + 1 Vol. Eisessig.

Das Gel wird hierbei entwässert, die Gelatine stärker gehärtet, durch die saure Reaktion der Farbstoff auf der Gelatine fixiert. Der Glycerin- bzw. Propylenglykol-zusatz dient als Weichmacher. Die nachgehärtete Gelatine schrumpft nicht beim Trocknen.

Man lässt den fixierten Gelfilm hängend an der Luft trocknen, bis er sich trocken anfühlt. Zum völligen Durchtrocknen quetscht man den noch sehr schmiegsamen Film auf eine Glasplatte, auf der er schwach anklebt. Nach dem Trocknen über Nacht wird er biegsam-elastisch und bleibt nach dem Abnehmen von der Glasplatte glatt. Die Elektrokopien sind bezüglich Form und Intensität der Zonen originalgetreu: Trübungen in den farbigen Zonen (s.o.) können hier prinzipiell nicht auftreten.

Alle elektrophoretisch wandernden Farbstoffe eignen sich für die Elektrokopie, besonders Farbstoffe mit Sulfosäuregruppen, z.B. Neucocin, Brilliantcarmoisin, Indigotetrasulfonat. Eine Ausnahme macht Amidoschwarz 10B, weil es elektrophoretisch nur sehr langsam wandert (geprüft in 0.2 M Ammonacetat bei pH 8.0) und erst bei stark alkalischer Reaktion, $\text{pH} > 10$ vom Protein eluiert wird. Bei Bromphenolblau muss die Indikatoreigenschaft berücksichtigt werden.

Die elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten sind etwas unterschiedlich, was sich in den Kopierzeiten ausdrückt. Indigotetrasulfonat $>$ Neucocin $>$ Bromphenolblau.

Auch Anfärbungen mit sulfurierten Triphenylmethanfarbstoffen, z.B. Säurefuchsin (Rubin S) oder Tintenblau, lassen sich elektrokopieren. Die Farbstoffe wandern allerdings als ungefärbte "Farbbasen" in das Gel und werden erst beim Ansäuern der Kopien wieder sichtbar. Bei Zusatz von 2 ml 85 %iger H_3PO_4 /100 ml Fixierbad treten die Farben rasch und haltbar wieder in Erscheinung. Die Unsicherheit in der Kontrolle des quantitativen Farbstoffübergangs spricht jedoch gegen die Anwendung dieses Farbstofftyps.

Beim Elektrokopieren wandert lediglich der Farbstoff in das Gelatinegel, das denaturierte Protein verbleibt auf dem Pherogramm und kann dort erneut angefärbt

werden, so dass es wieder im ursprünglichen Zustand vorliegt. Es wird vorher etwa 30 Minuten gewässert, um eventuell anhaftende Gelatinepartikel abzuspülen.

Bei gut denaturierten Proteinen können vom gleichen Pherogramm mehrere gleichwertige Kopien angefertigt werden, die im Extinktionschreiber gleiche Kurven geben. Zur Demonstration zeigen wir die Extinktionskurven von 2 aufeinander folgenden Elektrokopien von Serum- und Prolaktinpherogrammen (Fig. 1 und 2).

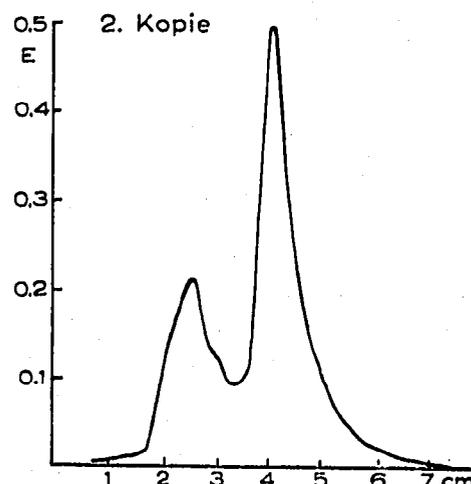
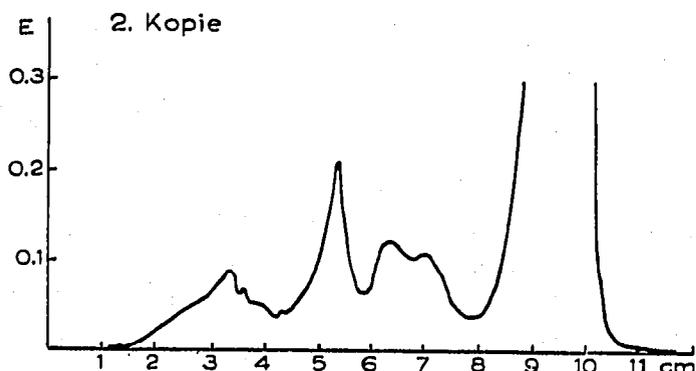
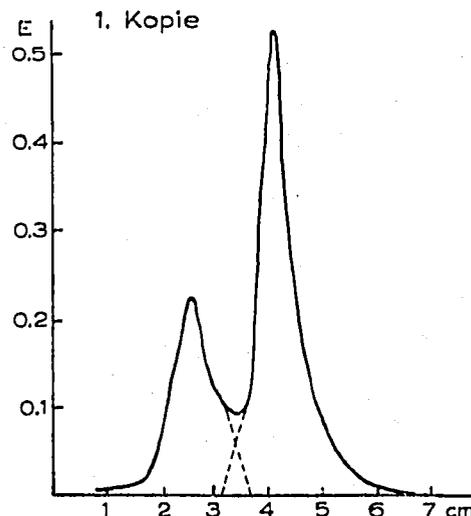
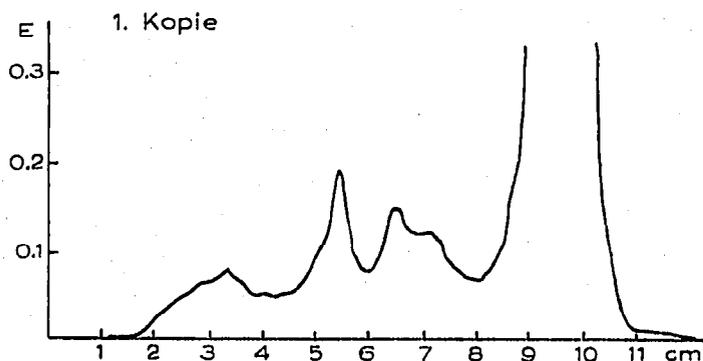


Fig. 1. 5 μ l Kaninchenserum. Veronalpuffer, pH 8.6, 0.6 μ . Papier: Machery u. Nagel 214. Neuccocin-färbung. Extinktionskurven bei 522 $m\mu$. Spaltlänge = Zonenlänge = 25 mm.

Fig. 2. 250 γ Prolaktinpräparat. Veronalpuffer, pH 8.6, 0.06 μ . Papier: Machery u. Nagel 214. Neuccocin-färbung. Extinktionskurven bei 522 $m\mu$. Spaltlänge = Zonenlänge = 22 mm.

Die registrierten Kurven decken sich. Bei beiden Kopien des Prolaktinpherogramms ist das Verhältnis der Extinktionskurvenflächen 2.1:1. Das Prolaktin befindet sich in der schneller laufenden, stärkeren Zone.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die Auswertung in Extinktionenschreibern werden Elektropherogramme als trockene, durchsichtige Filme hergestellt. Es werden 3 Wege zur Herstellung solcher Trockenfilme besprochen.

(1) Elektrophorese in durchsichtigen Gelen auf durchsichtigen Trägerfolien. Es wird ausser dem bekannten Agargel ein Collodiumgel verwendet, welches sehr durchsichtige Filme liefert.

(2) Pherogramme auf Trägern aus Acetylcellulose (Acetylpapier, Membranfolien) werden durch Lösungsmittel zu durchsichtigen Filmen gesintert. Die Durchsichtigmachung von Membranfolien wird durch Phenolspray verbessert, so dass völlig durchsichtige Filme entstehen.

(3) Es wird ein elektrophoretisches Kopierverfahren angegeben, bei dem der Farbstoff von einem Papierpherogramm auf einen durchsichtigen Film aus gehärteter Gelatine übertragen wird. Vom gleichen Original können mehrere Kopien angefertigt werden.

Es werden Arbeitsvorschriften für die Herstellung der durchsichtigen Pherogramme gegeben.

SUMMARY

For purposes of evaluation in extinction recorders, electropherograms were prepared as dry, transparent films. Three methods for preparing such dry films are discussed.

(1) Electrophoresis in transparent gels on transparent supporting films. Besides the well-known agar gel, a collodion gel was used, which gave very transparent films.

(2) Pherograms on supports consisting of acetyl cellulose (acetylated paper, membrane films) were sintered to transparent films by means of solvents. The transparency of membrane films is improved by a phenol spray, completely transparent films being obtained.

(3) An electrophoretic printing method is described in which the stain is transferred from a paper pherogram to a transparent film of hardened gelatin. More than one copy can be made from the same original.

Procedures for preparing the transparent pherogram films are given.

LITERATUR

- ¹ J. BARROLIER, *Naturwiss.*, 42 (1955) 126.
- ² P. GRABAR UND C. A. WILLIAMS, JR., *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 67;
J. URIEL UND P. GRABAR, *Ann. inst. Pasteur*, 90 (1956) 427.
- ³ K. V. GIRI, *Naturwiss.*, 43 (1956) 226.
- ⁴ J. BARROLIER, *Naturwiss.*, 44 (1957) 428.
- ⁵ K. H. HÖLZER, *Dissertation*, Berlin, 1960;
J. BARROLIER, E. WATZKE UND K. H. HÖLZER, *Naturwiss.*, 43 (1956) 398.