

## PRÄPARATIVE ZONENELEKTROPHORESE IM GIPSBLOCK

W. BOCKEMÜLLER UND P. KAISER

*Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main (Deutschland)*

(Eingegangen am 13. August 1964)

Die Methodik der Papierelektrophorese — des Prototyps der Zonenelektrophorese — lässt sich nicht ohne weiteres in den grösseren präparativen Masstab übertragen. Die Verwendung von Cellulose als stabilisierendes Medium führt zu Schwierigkeiten, die insbesondere in der Inhomogenität der Stabilisierungsfüllung und deren adsorptiven Eigenschaften begründet sind. Andere Stabilisierungsmittel, wie gequollene Stärke, Polyvinylchlorid u.a. vermeiden zwar diese Nachteile, aber sie geben breiförmige Füllungen, deren Aufarbeitung nach der elektrophoretischen Zerlegung der Substanzgemische Nachteile bietet, welche bei der Verwendung eines formbeständigen Füllmaterials nicht auftreten.

Bei der Suche nach einem formbeständigen Füllmaterial, welches nach Beendigung der Elektrophorese freigelegt werden kann, sodass die Zonen der Einzelkomponenten visuell — im sichtbaren oder U.V.-Licht, oder nach Anfärbung eines Abklatsches — festgestellt und durch Zerteilen des Füllkörpers isoliert werden können, zeigte sich, dass Gips eine für viele Zwecke sehr gut verwendbare Stabilisierungsfüllung ergibt.

### GIPS ALS STABILISIERENDES MEDIUM

Wird gebrannter Gips ( $\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ ) mit vier Gewichtsteilen Wasser angeteigt, so entsteht eine dünnflüssige Suspension, welche nach einiger Zeit zu einer kompakten Masse erstarrt. Wie die Rechnung ergibt, besteht diese zu etwa 12 Vol. % aus dem Dihydrat  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Dieses günstige Verhältnis von Festkörper zu Flüssigkeit hat bei der Elektrophorese zur Folge, dass die Poren der Füllung, welche aus verfilzten Nadelchen des Dihydrats besteht, relativ weit sind und nur eine geringe Elektrosmose verursachen. Ein lufttrockenes Formstück der Gipsfüllung schwimmt zunächst auf Wasser, bis es durchfeuchtet ist.

Für elektrophoretische Zwecke kann käuflicher gebrannter Gips nicht verwendet werden, er ist zu unrein. Ein genügend reines Präparat gewinnt man leicht aus käuflichem "Calciumsulfat, gefällt, gepulvert"  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Fa. Merck, Darmstadt, welches dicht gepresst in einer Schale im elektrischen Ofen etwa 5 Std. auf  $150^\circ$  erhitzt, anschliessend gepulvert und durch ein Sieb (Din 20, 400 Maschen/cm<sup>2</sup>) gegeben wird. Das Präparat wird in verschlossener Flasche aufbewahrt.

Der so gebrannte Gips erstarrt, mit vier Gew. Teilen Wasser verrührt, sehr langsam; nach 30 Min. hat sich ein klarer Überstand über der noch flüssigen Suspension gebildet. Der Gips ist jedoch nicht totgebrannt, sondern es fehlen ihm nur die Impfkristalle des Dihydrats. Die Kristallisationsgeschwindigkeit der Gips-Suspen-

sion, und damit die Grösse der Dihydrat-Nädelchen kann durch Zugabe von "Impfgips" zum gebrannten Gips geregelt werden: je rascher die Suspension des gebrannten Gipses erstarrt, desto feiner werden die Nädelchen des Dihydrats und die Poren der Füllung.

Zur Herstellung von Impfgips werden 40 g gebrannter Gips in 1 l Wasser etwa 2 Std. auf der Maschine geschüttelt. Das sehr feinkörnige Dihydrat wird abgesaugt, kurz mit Gips-gesättigtem Wasser, dann mit Alkohol gewaschen und auf der Nutsche trocken gesaugt. Das Produkt wird anschliessend nicht im Mörser zerrieben, sondern zwischen Papierblättern vorsichtig zu einem lockeren Pulver zerdrückt.

Als optimal für elektrophoretische Zwecke hat sich eine Erstarrungszeit der Gips-Suspension von 6–8 Min. erwiesen. Dies wird durch Zusatz von 1–3 % Impfgips zum gebrannten Gips erreicht; meistens werden 2.5 % Impfgips benötigt, wovon man sich durch einen Versuch überzeugt: 4 g gebrannter Gips werden mit 0.1 g Impfgips durch Schütteln (*nicht* durch Reiben in der Reibschale!) in einem Kölbchen vermischt, worauf 16 ml Wasser zugesetzt werden. Die Suspension wird 2 Min. durch Umschwenken gerührt, worauf man sie ruhig stehen lässt und von Zeit zu Zeit durch leichtes Neigen des Kolbens prüft, ob der Gips "steht".

Die Füllung der Elektrophorese-Kammer erfolgt stets mit rein wässriger Gips-Suspension, also nicht mit Pufferlösung. Hierbei ist es wichtig, die Anwesenheit von Luftblasen in der Suspension zu vermeiden, da sie beim Aufsteigen in der erstarrenden Füllung feine senkrechte Flüssigkeitskanäle hinterlassen würden. Aus diesem Grund geschieht die Herstellung der Gips-Suspension im Vakuum.

In einem 2 l Rundkolben befinden sich 300 g gebrannter Gips und 4.5 g Impfgips, welche durch Schütteln gemischt werden. Der Kolben, welchem mittels Gummistopfen ein 1.5 l Tropftrichter aufgesetzt ist, wird durch den Tropftrichter an einer Ölpumpe auf etwa 0.1 mm Luftdruck evakuiert, worauf der Hahn des Trichters geschlossen wird. Nachdem in den Tropftrichter 1200 ml destilliertes Wasser gegeben wurden, wird der Hahn des Trichters so lange geöffnet, bis das Wasser bis auf einen kleinen Rest in den Kolben eingeströmt ist, worauf der Hahn verschlossen und der Kolbeninhalt stark geschüttelt wird. Gleichzeitig tritt eine Stoppuhr in Gang. Nach einer Minute Schütteln bleibt der Kolben zur Auflösung des Schaums bis zum Ablauf der zweiten Minute ruhig stehen, worauf der Hahn geöffnet und der Tropftrichter entfernt wird. Das Giessen der Gips-Suspension erfolgt durch einen Trichter gegen die Wand des Gefässes, um die Schaumbildung möglichst gering zu halten. Dann wird der Gips 1 Min. lang mit einem Glasstab zügig gerührt, um etwa an der Gefässwand haftende Luftblasen zu zwingen aufzusteigen und um die ungewollte, aber unvermeidbare Ausrichtung der Impfgips-Nädelchen, welche beim Einfüllen der Suspension vorzugsweise die Richtung des Flüssigkeitsstroms eingenommen hatten, zu zerstören. Aus diesem Grund wird der Rührstab zum Schluss nicht einfach hochgezogen, sondern unter ständigem Rühren langsam immer höher gehoben. Ein kleiner, im Ansatzkolben verbliebener Rest der Gips-Suspension lässt erkennen, wann die Füllung abgebunden ist.

Sobald dies der Fall ist, verschwindet auch ein sehr kleiner wässriger Überstand über der Gips-Suspension, der vorübergehend aufgetreten war. Die abgebundene Gipsmasse wird nun mit Gips-gesättigtem Wasser überschichtet und mindestens eine Stunde sich selbst überlassen. Sie kann in diesem Zustand beliebig lange stehen. Da an der Oberfläche der Gipsmasse fast stets kleine Unebenheiten zu finden

sind, wird die Oberfläche unter dem Gipswasser auf etwa 5–10 mm Tiefe mit Hilfe eines schräg gehaltenen Bleches abgeschabt. Der Abrieb wird mit Gipswasser herausgespült, die nun völlig glatte Oberfläche wieder mit Gipswasser abgedeckt, der Guss ist fertig.

Die Löslichkeit des Dihydrats  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in Wasser, etwa 0.2 %, muss beim Arbeiten mit diesem Medium berücksichtigt werden. Dies bedeutet zunächst, dass Elektrolytlösungen, welche sich mit  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{SO}_4^{2-}$  unter Bildung von schwer löslichen Verbindungen umsetzen, ausgeschlossen sind. So ist Phosphat als Puffersubstanz nicht verwendbar, dagegen sind (für die Elektrophorese von Proteinen) Veronalpufferlösungen gut geeignet, ebenso Boratlösungen (pH 9,6 für die Elektrophorese von Kohlehydraten).

Grundsätzlich muss jede Lösung, Pufferlösung wie Substanzlösung, welche mit der Gipsfüllung in Kontakt kommt, mit Gips gesättigt sein. Würde die Gipsfüllung mit reinem Wasser durchgewaschen, so würden sich in der Masse feine senkrechte Kanäle bilden, welche sich infolge der Löslichkeit des Calciumsulfats rasch vergrößern. Sofern nicht besondere Verhältnisse vorliegen, stört die Löslichkeit des Calciumsulfats und die Anwesenheit der Ca-Ionen den Verlauf der Elektrophorese nicht, so z.B. bei der Elektrophorese von Human- und Tierseren, den Komponenten des Tuberkulins, d.h. seinen Proteinen, Kohlehydraten und Nucleinsäuren. Stoffe, welche schwer lösliche Ca-Salze bilden, können im Gipsblock natürlich nicht wandern; ein Beispiel hierfür ist der Farbstoff Congorot. Als besonderer Vorteil für die Anwendung von Gips als Stabilisierungsmedium erweist sich die Tatsache, dass der Gips keine Proteine adsorbiert, sodass sowohl der Trenneffekt wie Ausbeute sehr zufriedenstellend sind; ausserdem erlaubt dieses Verfahren die Anwendung von relativ grossen Elektrophorese-Kammern.

#### DIE ELEKTROPHORESE-APPARATUR

Die Elektrophorese-Apparatur ist eine Weiterentwicklung der früher in unserem Laboratorium gebauten Apparatur für präparative Elektrophorese in Agar-Gel<sup>1</sup>. Das Prinzip der flachen, kastenförmigen, senkrecht stehenden Elektrophorese-Kammer, aus der das Trägermedium nach Beendigung der Elektrophorese in seiner ursprünglichen Form herausgebracht wird und des Elektrolyt-Kreislaufs, welcher gleichzeitig die Kühlung der Elektrophorese-Kammer bewirkt, wurde beibehalten, da die Dimension der Apparatur die Zerlegung von etwa 1 g Substanz in einem Arbeitsgang erlauben soll.

Die Bauelemente der Apparatur bestehen aus:

- (a) Elektrophorese-Kammer;
- (b) Kathode;
- (c) Trog mit Anode, Elektrolyt-Zulauf und -Ablauf;
- (d) Pufferreservoir mit Umlaufpumpe und Kühleinrichtung.

##### (a) Die Elektrophorese-Kammer

Die aus Plexiglas gebaute Elektrophorese-Kammer (Fig. 1) besitzt oben einen lichten Querschnitt von  $200 \times 32$  mm, unten von  $200 \times 22$  mm. Ihre Höhe beträgt 320 mm. Diese Form bietet eine genügende Kühlfläche für die Ableitung der Stromwärme, das keilförmige Profil gibt der erstarrten Gipsfüllung den mechanischen Halt.

Die 5 mm starke Vorder- und Rückwand der Kammer ist durch je vier massive Plexiglasrippen versteift. Die Vorderwand ist abnehmbar, sie wird beiderseits durch sieben Plexiglasschrauben gehalten, die übrigen Plexiglasteile sind untereinander durch Verschraubung und Verkittung verbunden. Die Kammer besitzt oben zwei Querträger zum Einhängen in den Trog. Die Querträger besitzen zwei senkrechte

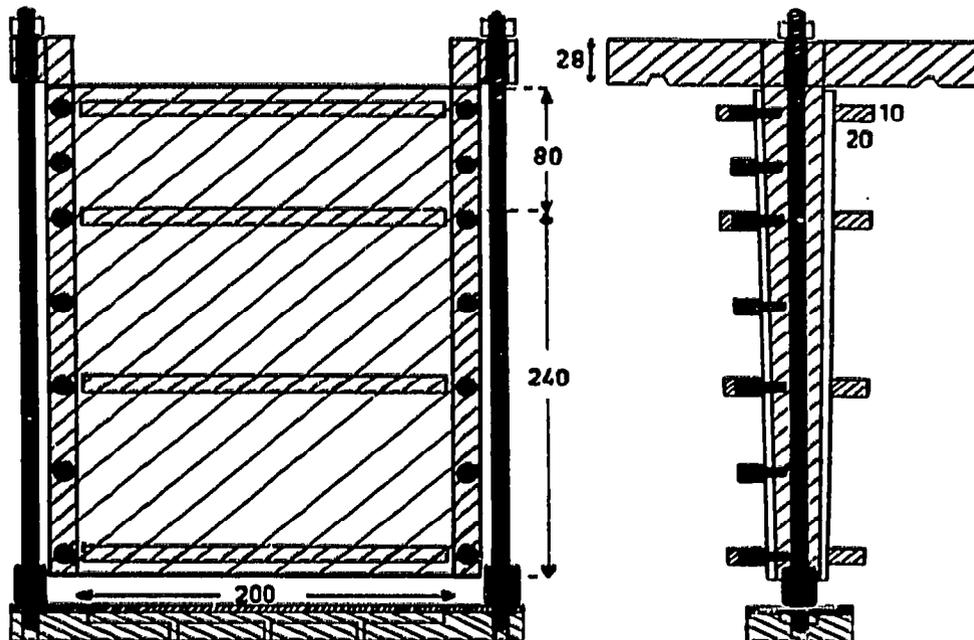


Fig. 1. Die Elektrophorese-Kammer.

Bohrungen, durch welche die Haltestangen für den Kammerboden laufen. Der Kammerboden ist abnehmbar, besitzt oben eine 6 mm tiefe Aussparung im Format  $190 \times 17$  mm, in welche drei senkrechte Luftlöcher gebohrt sind. Der Kammerboden bildet so einen Rahmen für den unteren Abschluss der Kammer; der Rahmen ist mit einem 5 mm starken Schaumgummibelag versehen. Er wird zum Füllen der Kammer mit einer Polyäthylenfolie abgedeckt, welche zwei Bohrungen besitzt. Mit den beiden Haltestangen (Plexiglas) wird die Folie an der Bodenplatte angeschraubt. Mit Hilfe der beiden oberen Muttern wird schliesslich der Kammerboden dicht mit der Kammer verbunden. Durch die Vertiefung im Kammerboden ragt die fertige Füllung unten etwas aus der Kammer kissenförmig abgerundet heraus, sodass sich keine Luftblasen an der Bodenfläche der Gipsfüllung sammeln können.

#### (b) Die Kathode

Oberhalb der Gipsfüllung wird in die Elektrophorese-Kammer die aus Plexiglas gefertigte Kathode eingesetzt, welche in den Elektrolyt-Überstand der Kammer eintaucht. Die Kathode besteht aus dem Sockel-Teil und dem Kopf-Teil, welche in Fig. 2 durch die unterschiedliche Schraffur gekennzeichnet sind; beide Teile sind durch zwei Plexiglasschrauben verbunden. Der unten offene, 19 cm lange Sockel-Teil, welcher einen horizontalen Platindraht trägt, ist so dimensioniert, dass er gerade in einen Cellophanschlauch (40 mm  $\varnothing$ ) eingeschoben werden kann. Der Schlauch wird an beiden Enden verknotet, die Enden werden später am Kopf-Teil befestigt. Im

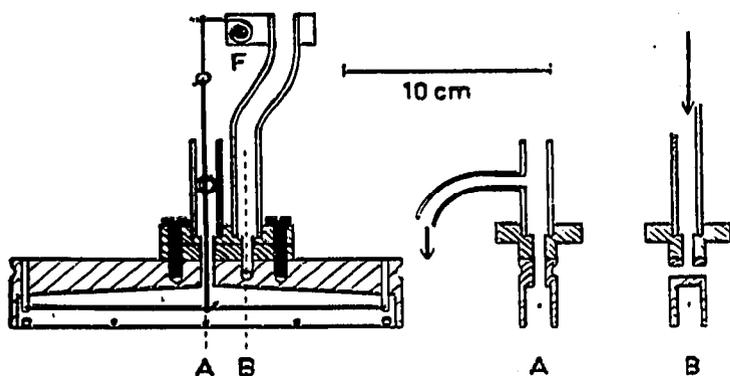


Fig. 2. Die Kathode.

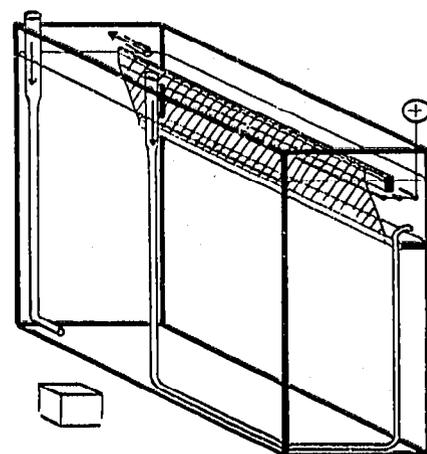


Fig. 3. Der Trog mit Anode.

Sockel-Teil befinden sich oben zwei Gewinde und zwei Durchlässe für die Elektrolytlösung, denen die Bohrungen im Kopf-Teil entsprechen. Mit einem Korkbolrer werden die den Bohrungen entsprechenden vier Fenster in den Cellophanschlauch geschnitten, worauf Sockel- und Kopf-Teil mit zwei Plexiglasschrauben verbunden werden; der dazwischen verbliebene Teil des Cellophanschlauchs bildet die Dichtung. Nachdem der horizontale Platindraht mit einem Pt-Zwischenstück mit dem federnden Stromanschluss F verbunden ist, ist die Kathode gebrauchsfertig.

Der Elektrolyt fließt in lebhaftem Strahl ständig in den Zufluss bei F, tritt in den Sockel-Teil und teilt sich an der Querbohrung (Schnitt B). Eine Längsrille in der Höhe der Querbohrung, welche um den ganzen Sockel-Teil verläuft, verteilt den eintretenden Elektrolyt innerhalb der Cellophanhülle auf die beiden Längsseiten des Sockel-Teils. Durch je fünf Bohrungen in diesen Längsseiten strömt der Elektrolyt von unten her zur Pt-Kathode, steigt in den Ablauf (Schnitt A), den er durch einen seitlichen Überlauf verlässt. Der Kopf-Teil der Kathode ist oben so breit (45 mm, Schnitt A), dass er beim Einsenken in die Elektrophorese-Kammer auf deren Vorder- und Rückwand aufsitzt, wobei der untere Teil der Kathode 50 mm tief in die Elektrophorese-Kammer hineinragt und in den Elektrolyt-Überstand der Kammer eintaucht. Auf diese Weise wird das Diaphragma ständig von innen mit frischer Pufferlösung gespült und der gebrauchte Elektrolyt entfernt; da die Kathodenflüssigkeit anschliessend mit dem anodenseits sauer gewordenen Elektrolyt ständig im Kreislauf gemischt wird, bleibt das ursprünglich eingestellte pH der Elektrolytlösung auch bei höherer Stromstärke (bis 1.5 A) tagelang konstant, obwohl in 26.8 A·Std. ein Mol-Äquivalent Säure bzw. Lauge an den Elektroden gebildet wird.

### (c) Der Trog mit Anode und Elektrolyt-Umlauf

Fig. 3 zeigt den aus Plexiglas gefertigten Trog. Die Innenmasse des Troges sind: Länge 32 cm, Breite 16 cm, Höhe 36 cm; die Vorder- und Rückwand ist 0.5 cm stark, die Seitenwände 1.5 cm und der Boden 2 cm. Alle Teile sind mit Metallschrauben verschraubt, ihre Berührungsflächen mit Araldit gekittet. Der Trog fasst bis zum Niveau des in der linken Seitenwand angebrachten Trog-Abflusses ca. 16 l Elektrolyt.

Die Anode, drei horizontale Platindrähte 2 cm unter dem Flüssigkeitsniveau, ist parallel zur Rückwand fest im Trog eingebaut. Der Anodenraum ist durch Cellophan gegen den übrigen Flüssigkeitsraum fast ganz abgeschlossen; das Cellophan

ist an zwei (herausnehmbaren) horizontalen Leisten befestigt, welche auf seitlich angebrachten Trägern ruhen. Auf der linken Seite des Troges reicht das Cellophan bis zur Seitenwand, auf der rechten Seite ist im Cellophan ein Fenster ausgeschnitten, durch welches der Flüssigkeitsstrom eintritt; die Flüssigkeit wird so, entlang den Anoden, in den Trog-Abfluss geführt.

Der Elektrolyt-Zulauf ist geteilt: die Hauptmenge tritt in das in Fig. 3 links gezeichnete Glasrohr ein, welches bis auf den Boden des Troges führt; die Flüssigkeit umspült und kühlt die Kammer und tritt schliesslich durch das rechts oben liegende Cellophan-Fenster in den Anodenraum ein, den sie durch den Trog-Abfluss verlässt. Der andere Teil (etwa ein Viertel) des Elektrolytzulaufs wird in den Kathodenzulauf geführt; er verlässt die Kathode durch ihren Überlauf, welcher knapp über dem in Fig. 3 gezeigten zweiten Glasrohr endet. Dieses Kathodenrohr führt zum Cellophanfenster des Anodenraums. Die Flüssigkeit im Kathodenrohr bildet einen geringen elektrischen Nebenschluss für die Elektrolytwanderung; aus diesem Grund wurde das Rohr nicht auf dem kürzesten Wege zum Anodenraum geführt. Der elektrische Nebenschluss kommt praktisch nicht zur Geltung, da das Verhältnis des Widerstandes dieser relativ engen und langen Leitung zum Widerstand des Stromweges durch die geräumige Elektrophorese-Kammer und den umgebenden Troginhalt nur einige Promille Nebenschluss-Leistung erwarten lässt.

*(d) Das Puffer-Reservoir mit Umlaufpumpe und Kühleinrichtung*

Der aus dem Trog-Überlauf abfliessende Elektrolyt fliesst frei in einen Trichter, der zum Puffer-Reservoir führt, einem runden Glastrog von 12 l Fassungsvermögen.

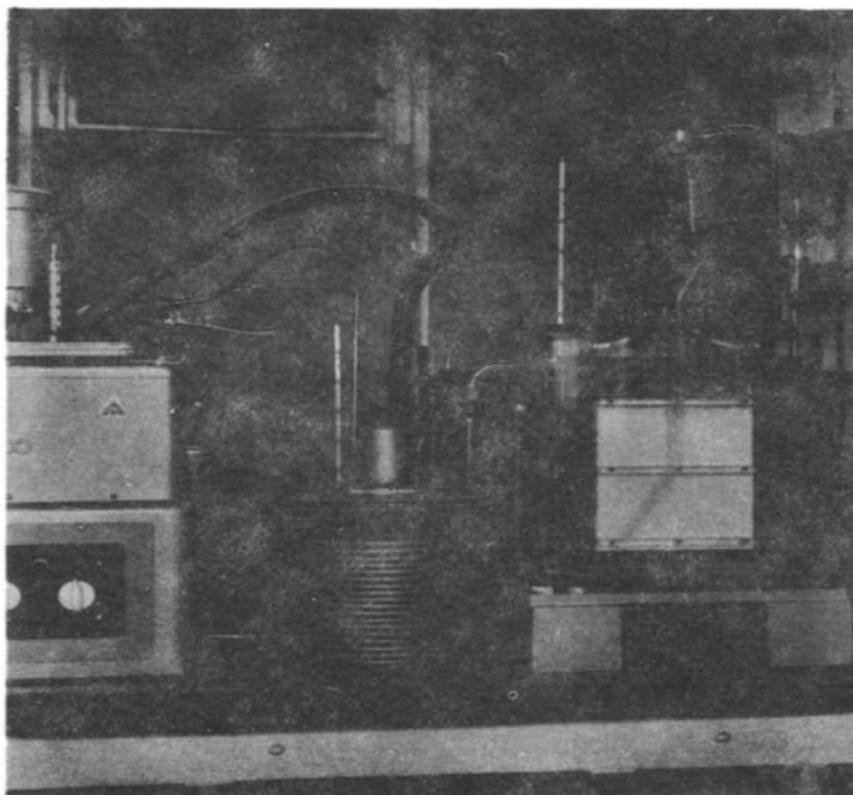


Fig. 4. Elektrophorese-Apparatur.

Der Plexiglasdeckel des Troges trägt eine elektrische Förderpumpe aus V2A-Stahl (Fa. Heidolph, Schwabach) mit einer Förderleistung von 3 l/Min., im Trog befindet sich eine 14 m lange Kühlschlange aus V4A-Stahl ( $8 \times 1$  mm), welche von einem Kühlaggregat (Ultra-Kryomat Typ TK 30, Fa. Messgerätewerk Lauda/Tauber) gespeist wird. Fig. 4 zeigt die komplette Apparatur.

#### DIE ARBEITSMETHODE

##### (a) Die Pufferlösungen

Für den in ständigem Umlauf kreisenden Elektrolyt sind nur solche Pufferlösungen verwendbar, welche mit Calciumsulfat nicht reagieren. Zu dieser Einschränkung treten noch folgende Erfordernisse: Die Puffersubstanz darf elektrochemisch nicht verändert werden — also ist z.B. Acetat nicht brauchbar, da das Acetat-Ion bei seiner Entladung zu  $\text{CO}_2$  und Äthan umgesetzt wird, und letzten Endes soll die Puffersubstanz in Wasser nicht schwer löslich sein, da sie sonst an der Elektrode kristallin abgeschieden werden könnte. Unter dieser letzten Schwierigkeit leidet z.B. der übliche Veronal-Veronal-Na-Puffer, denn bei längerem Stromdurchgang fällt Veronal aus, welches sich zunächst auf der Anode abscheidet, später auch ungelöst fein verteilt in der gekühlten Pufferlösung ( $5-15^\circ$ ) verbleibt. Diese Schwierigkeit lässt sich, z.B. bei der elektrophoretischen Zerlegung von Seren, leicht dadurch umgehen, dass als Grundlage des Elektrolyten Natriumsulfat ( $0.1 M$ ) verwendet wird, dessen Lösung durch  $0.01 M$  Veronal-Na und  $0.36$  g/l Veronal auf pH 8.5 eingestellt ist. Nun ist unter Gewährleistung des gewünschten pH die Konzentration an Veronal so gering, dass dieses während der ganzen Elektrophoresedauer in Lösung verbleibt. Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses gepufferten Elektrolyten ist natürlich, dass er mit Calciumsulfat gesättigt ist; eine Abscheidung von Calciumhydroxyd findet an der Kathode nicht statt.

Für die elektrophoretische Trennung von Kohlehydratgemischen hat sich ein Gips-gesättigter  $M/20$  Boratpuffer vom pH 9.6 bewährt; Kohlehydrate, welche benachbarte *cis*-ständige Hydroxylgruppen besitzen, wandern unter diesen Umständen zur Anode, während die übrigen durch die geringe osmotische Strömung sehr langsam in die Richtung zur Kathode verlagert werden.

##### (b) Die Vorbereitung der Elektrophorese-Kammer

Wie schon geschildert wurde, erfolgt das Giessen des Gipsblockes mit reinem Wasser. Die Kammer wird nach dem Anbringen des Kammerbodens in einem Gestell senkrecht gelagert und etwa 25 cm hoch mit Gips-Suspension gefüllt (etwa 1.2 l). Nachdem der Gips abgebunden ist und die oberste Schicht der Füllung mit dem Schaber abgenommen wurde, entfernt man den Kammerboden und gibt auf die Oberfläche der Gipsfüllung etwa 20 ml einer mit Methylenblau stark gefärbten Gipslösung. Diese dringt im Laufe einiger Minuten in die Gipsfüllung ein, der Ablauf tropft in eine Schale. Das Nachwaschen der Methylenblau-Zone erfolgt mit gipsgesättigter Pufferlösung. Dieses Verfahren zeigt nicht nur, wann der ganze Gipsblock genügend mit Pufferlösung durchgewaschen wurde, sondern es lässt Fehler im Guss, insbesondere (sehr selten auftretende) Kanäle, die durch verspätet aufgestiegene Luftblasen verursacht wurden, mit Sicherheit erkennen. Die horizontale Farbstoffzone bewegt sich ohne Verzerrung (mit einer Geschwindigkeit von rund 5 cm in 40 Min.) durch

die ganze Füllung abwärts. Kleine, manchmal sichtbar werdende Unebenheiten machen sich im späteren elektrophoretischen Lauf nicht geltend. Sobald der Ablauf farblos geworden ist, nach etwa 4–5 Std., kann die Eintragung der Substanzlösung beginnen.

(c) *Die Eintragung der Substanzlösung*

Die Substanzlösung muss Gips-gesättigt sein. Hierfür ist der feinkörnige "Impfgips" besonders geeignet: Nach Zugabe einer kleinen Gipsmenge zu dem bereits dialysierten Serum oder der in Puffer gelösten Substanz (Konzentration bis etwa 5 %) überlässt man die Suspension etwa 1 St. sich selbst, worauf zentrifugiert wird und die klare Substanzlösung leicht von dem Gips-sediment getrennt werden kann.

Sobald in der horizontal aufgehängten Kammer der letzte Rest des Puffer-überstandes in das Gipsbett eingedrungen ist, gibt man 20–25 ml der Substanzlösung auf die Kammerfüllung; bei einem Kammerquerschnitt von rund 50 cm<sup>2</sup> ergibt dies eine Flüssigkeitsschicht von etwa 5 mm Höhe, welche im Lauf von einigen Minuten einzieht. Vorher hat man sich etwa 80 ml Pufferlösung bereitgestellt, mit welchem Volumen man die Substanzschicht durch "Einwaschen" schrittweise, d.h. durch Aufgiessen von jeweils 10 ml Flüssigkeit, tiefer setzt. Nach Zusatz des gesamten Einwaschvolumens befindet sich die Oberkante der Substanzfüllung etwa 1.5 cm unter der Gips-Oberfläche, eine Tiefe, welche für den Start einer Serum-Elektrophorese ausreicht, da die Fraktion mit der geringsten Wanderungsgeschwindigkeit, das  $\gamma$ -Globulin, praktisch an der Startposition verbleibt und sich dort nur durch Diffusion ausbreitet. Da die Gipsfüllung relativ dicht ist, besteht keine Gefahr, dass die Gipsfüllung, über der sich vorübergehend kein flüssiger Überstand mehr befindet, "trocken läuft"; durch Kapillarwirkung bleibt die gesamte Füllung gleichmässig feucht und es wird keine Luft in das Gipsbett eingezogen.

Nun setzt man die (innen mit Pufferlösung gefüllte) Kathode in die Elektrophorese-Kammer und das Ganze in den mit Puffer gefüllten Trog. Überschüssige Pufferlösung läuft aus dem Trog — in welchem vorher schon die Cellophanabsper- rung des Anodenraums und das Kathodenrohr angebracht war — rasch durch den Trogablauf ab. Gleichzeitig füllt man in die Elektrophorese-Kammer den Elektrolyt-Überstand bis zum endgültigen Niveau auf; dies soll möglichst rasch geschehen, damit die Füllzone der Substanz im Gipsblock nicht durch unbeabsichtigte Flüssigkeitsströmung verlagert wird.

Sobald dies geschehen ist, wird möglichst bald der "Niveau-Heber" in eine der Ecken der Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Er hat etwa 4 mm lichte Weite, taucht in die Elektrophorese-Kammer bis etwa 2 cm oberhalb der Gipsfüllung ein und reicht auf der Aussenseite der Kammer bis fast an deren unteres Ende hinab (der durch den Niveau-Heber bedingte elektrolytische Nebenschluss ist bei dessen Querschnitt und Länge unerheblich). Dieses U-Rohr besitzt oben einen Glasansatz mit kurzem Gummischlauch-Ende, sodass es nach dem Einsetzen durch Ansaugen gefüllt werden kann, worauf das Ende mit einem Quetschhahn verschlossen wird. Der Niveau-Heber hat sich beim Lauf der Elektrophorese als sehr wertvoll erwiesen, da er Niveauunterschiede zwischen Kammer und Aussenflüssigkeit, welche durch Elektroosmose entstehen, unterdrückt. Es hat sich gezeigt, dass zwar in der Gipsfüllung (in Na-Sulfat-Veronal-Puffer) keine ins Gewicht fallende elektroosmotische Strömung auftritt, wohl aber im Cellophandiaphragma der Kathode. Dort wandert

Wasser aus dem Kammerüberstand in die Kathoden-Zelle, wodurch das Niveau des Kammerüberstandes absinkt; ohne Niveau-Heber würde sich deshalb von unten her Elektrolyt durch die Gipsfüllung nachschieben, wodurch sehr langsam wandernde Substanzen in den Elektrolytüberstand verlagert würden; nicht dialysierbare Stoffe verbleiben zwar dort und lassen sich aus dem Überstand isolieren, aber sie entziehen sich dem später durchzuführenden Positionsnachweis der Zonen im Abklatsch des Gipsblockes.

Hier sei noch auf eine Eigentümlichkeit von Proteinlösungen hingewiesen. Wie schon geschildert wurde, bleiben Farbstoffzonen im Gipsblock geschlossen und horizontal, wenn in der Füllung eine Flüssigkeitsströmung herbeigeführt wird. Unter nimmt man den gleichen Versuch mit einer angefärbten Proteinlösung grösserer Konzentration, etwa mit Serum, das mit Amidoschwarz versetzt ist, so zeigt sich ein abweichendes Verhalten, welches auf die grössere Viskosität solcher Lösungen zurückzuführen ist. Die Vorderfront der Proteinzone bleibt bei ihrer Wanderung zunächst völlig eben und horizontal; bei weiterem Durchwaschen der Zone bekommt diese auf ihrer Rückseite unweigerlich zackenförmige Ausbuchtungen. An solchen Stellen, an denen (auch in einwandfrei gefertigten Gipsfüllungen) zufällig eine stärkere Vermischung mit der nachdringenden Flüssigkeit erfolgt ist, ist die Viskosität geringer, die Strömung schneller, ein Prozess, der sich ständig vergrössert. Aus diesem Grund wird das Einwaschen der Proteinzone in den Gipsblock beim Füllen der Kammer unter möglichst geringem Flüssigkeitsüberdruck, d.h. durch schrittweise Zugabe der Einwasch-Flüssigkeit durchgeführt, und die Zone wird nicht tiefer gesetzt, als es erforderlich erscheint. Die gleichen Gründe sind dafür massgeblich, dass die Zonen nach Beendigung der Elektrophorese aus dem Gipsblock durch Herausschneiden isoliert werden, denn das Durchwaschen der intakten Füllung (nach Art der Chromatographie) kann auch bei ursprünglich guter Schichtung der Zonen keine einwandfreien Eluate liefern.

Die Viskositätsunterschiede zwischen Protein- und Pufferlösung wirken sich im allgemeinen nur bei der Strömung der Flüssigkeiten, nicht aber bei der elektrophoretischen Wanderung der Zonen in der stehenden Flüssigkeit aus, solange die Proteinkonzentration nicht zu hoch ist. Bei höheren Proteinkonzentrationen, wie z.B. bei der Albuminzone der (unverdünnt gelaufenen) Seren führt der Temperaturunterschied zwischen der Aussenschicht und dem Inneren des Gipsbettes dazu, dass diese Zone nicht die sonst übliche horizontale Schichtung besitzt, sondern in der Mitte schneller läuft als aussen, wie ein Abklatsch des Querschnitts durch den Gipsblock zeigt. Die Wölbung dieser Zone gestattet aber immer noch die einwandfreie Abtrennung des nachfolgenden  $\alpha_1$ -Globulins; dieses und die übrigen Globulinzonen sind auch im Querschnitt der Füllung horizontal geschichtet.

#### *(d) Die Durchführung der Elektrophorese*

Sobald der Niveau-Heber funktioniert, wird der Elektrolytumlauf in Gang gesetzt; das Kühlaggregat war schon vorher in Betrieb und hatte den im Pufferreservoir befindlichen Puffer auf die Arbeitstemperatur ( $5-15^\circ$ ) gekühlt, sodass nun die Elektrophorese-Kammer im Laufe etwa einer Stunde ohne schroffen Temperaturwechsel auf die Arbeitstemperatur gebracht wird. Mit Beginn der Kühlung kann der Elektrophorese-Stromkreis eingeschaltet werden. Die Badtemperatur wird im Kühlaggregat, im Pufferreservoir und im Trog (in der Nähe des Anodenfensters) gemessen.

Eine Regulierung der Stromstärke ist nur solange nötig als sich die Temperatur der Elektrophorese-Kammer durch die Kühlung erniedrigt; bei konstanter Arbeitstemperatur bleibt die Stromstärke der Elektrophorese unverändert. Zweckmässig ist ein Gleichstromanschluss von 140 und 220 V mit 2 A Maximalbelastung. Anders als bei der Papierelektrophorese wird bei dieser Apparatur nicht die Spannung, sondern die Stromstärke gemessen und konstant gehalten; bei den konstanten Dimensionen der Apparatur und Anwendung des gleichen Puffers bei gleicher Temperatur ist die Wanderungsgeschwindigkeit einer bestimmten (Protein-)Fraktion proportional der Stromstärke (d.h. A/cm<sup>2</sup> Kammerquerschnitt). Einer Halbierung der Elektrolytkonzentration entspricht unter sonst unveränderten Bedingungen dann etwa eine doppelte Laufgeschwindigkeit dieser Fraktion.

(e) *Die Isolierung der Elektrophorese-Fractionen*

Nach Beendigung der Elektrophorese wird der in der Kammer befindliche Überstand — in dem sich eine Fraktion befinden kann — entnommen, die Kammer flach gelegt und die Vorderwand der Kammer entfernt. Schon im Tages- oder U.V.-Licht lassen sich oft Zonen im Gipsblock erkennen (so das stets durch Bilirubin gefärbte Albumin des Humanserums). In allgemeinen werden die Zonen durch das Abklatschverfahren lokalisiert. Zu diesem Zweck wird auf die nun freiliegende Fläche des Gipsblockes eine grössere Plexiglasscheibe aufgelegt, das Ganze gewendet und in den Abstreifer gelegt. Der Abstreifer ist eine am Tisch befestigte Holzplatte, auf welcher ein massiver senkrecht stehender Plexiglasstreifen befestigt ist, der mit seiner Länge von 20 cm in den lichten Querschnitt der Kammer passt. Beim Abziehen der Kammer in Richtung zur Kathode hält er den Gipsblock fest, der Block liegt dann frei und unbeschädigt auf seiner Unterlage.

Die Oberfläche des Blockes ist zunächst noch zu feucht für die Abnahme eines guten Abklatsches; deshalb werden die beiden ersten Abklatsche, bei denen die Flüssigkeit sehr schnell in das Filterpapier einzieht, verworfen. Zur Abnahme des Abklatsches wird Papier Whatman Nr. 1 oder 4 verwendet: ein passendes Format ist mit Tesafilm an der Aussenwand eines Glaszylinders von etwa 15 cm  $\varnothing$  befestigt. Auf dem Papier ist mit einem Querstrich die Stelle markiert, welche beim Abrollen des Zylinders auf die Kathodenkante des Blockes zu liegen kommt. Das Abrollen des Zylinders erfolgt nach Massgabe der gut sichtbaren Durchfeuchtung des Papiers an der Auflagestelle. Nach dem Abnehmen der Abklatsche wird der Gipsblock bis zu seiner Aufarbeitung mit einer Schale abgedeckt. Für die Anfärbung der Zonen der Serumproteine und anderer Proteine, welche durch Pikrinsäure fällbar sind, hat sich das folgende, rasch ausführbare Verfahren bewährt, welches auf der Anfärbung der Protein-Pikrinsäure-Fällung beruht: der im Ofen (110°) getrocknete Abklatsch kommt für 10 Min. in ein Bad, hergestellt durch Zusatz von 200 ml 3 %iger Essigsäure zu der Lösung von 0.5 g Bromphenolblau + 2.5 g Pikrinsäure in 50 ml Methanol. Anschliessend wird das Blatt in wiederholt gewechselter 3 %iger Essigsäure gewaschen, bis die proteinfreien Flächen rein weiss erscheinen. Der Bogen wird dann zwischen Filtrierpapier stark abgepresst; beim Einbringen in eine NH<sub>3</sub>-Atmosphäre färben sich die Proteinzonen tiefblau. Die Färbemethode ist wesentlich rascher durchführbar (in ca. 25 Min.) als die übliche mit Amidoschwarz und gibt stärker angefärbte Zonenbilder.

Der Abklatsch lässt erkennen, dass die (Protein-) Zonen an den Schmalwänden

der Kammer, wo die Kühlung sich am stärksten auswirkt, etwas zurückgeblieben sind. Deshalb wird vor der Zerlegung des Blockes auf beiden Längsseiten ein etwa 5–10 mm breiter Streifen mit einem langen Messer abgeschnitten und verworfen. Vorher hat man sich die beabsichtigte Zerteilung des Gipsblocks auf dem Abklatsch markiert, welcher nun nochmals auf den Block gelegt wird. Die Zonenmarkierung wird mit der Kante eines Blechstreifens in den Gipsblock leicht eingedrückt, worauf der Block im gewünschten Sinn mit Hilfe eines Messers oder durch Eindrücken eines entsprechend gebogenen Blechstreifens zerteilt wird.

Die in Wasser oder Pufferlösung gebrachten Gipsstücke lassen sich leicht zu einer homogenen Suspension zerteilen; der Gips wird abfiltriert, nach kurzem Nachwaschen ist er frei von Protein. Eine Adsorption von Protein an den Gips wurde nie beobachtet.

#### DIE ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG EINES FARBSTOFF-GEMISCHES

Ein erstes Beispiel zeigt die elektrophoretische Zerlegung eines Farbstoffgemisches (*o*-Nitranilin, Methylorange und Amido-schwarz 10B) in dem eingangs erwähnten Na-Sulfat-Veronal-Puffer ( $M/10$ , pH 8.5). Das *o*-Nitranilin wandert unter diesen Umständen nicht elektrophoretisch, es könnte nur durch eine elektro-osmotische Strömung verlagert werden. Die Farbstofflösung war vor Beginn der Elektro-

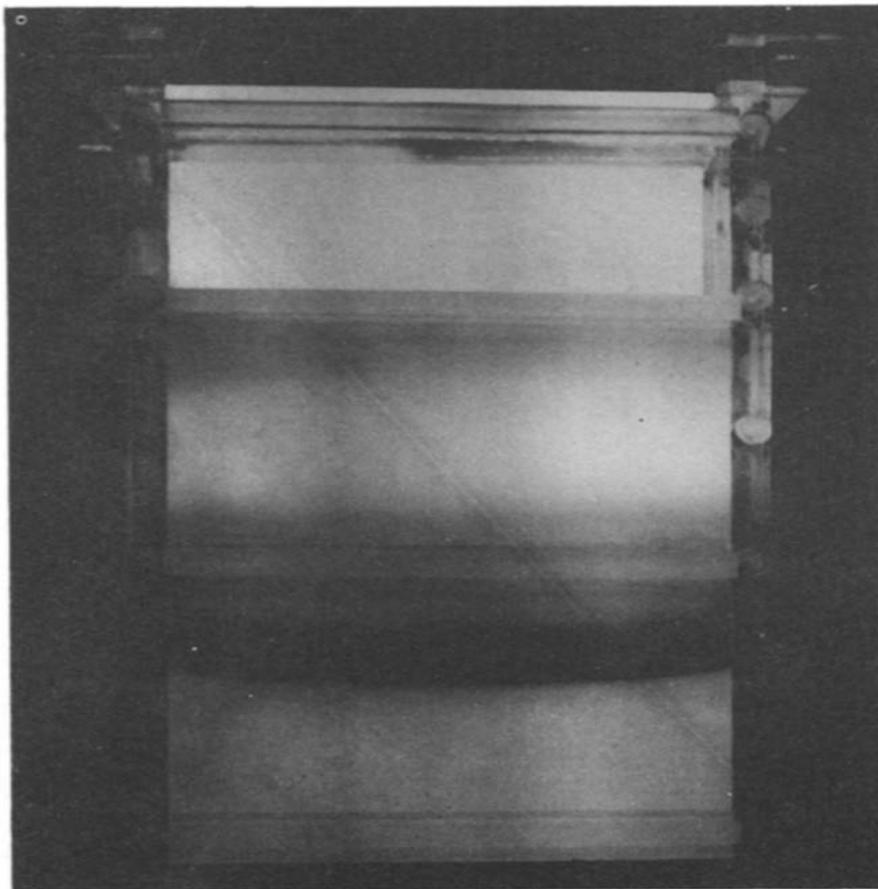


Fig. 5. Elektrophorese-Kammer mit Farbstoff-Zonen.

phorese auf 4 cm Tiefe eingespült worden, was ohne Schwierigkeit gelingt, da die Farbstofflösung nicht viskos ist. Die technischen Daten der Elektrophorese sind in Tabelle I zusammengefasst.

TABELLE I

## ELEKTROPHORETISCHE ZERLEGUNG EINES FARBSTOFFGEMISCHES

---

Pufferlösung:	0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Veronal, pH 8.5
Substanzmenge:	10 ml Farbstofflösung
Startposition:	4 cm Tiefe
Spannung:	110 V =
Stromstärke:	0.5 A
Temperatur:	12°
Dauer:	18 St.

---

Die Fig. 5 zeigt die nach dem Abschluss der Elektrophorese herausgenommene Kammer. Die oberste Farbstoffzone, das *o*-Nitranilin, hat sich durch Diffusion verbreitert und wurde durch die sehr geringe Elektroosmose nur wenig nach oben verlagert. Das Amidoschwarz erweist sich im Gipsblock als die am schnellsten wandernde Substanz; in Cellulose, die es stark adsorbiert, wäre es nicht vom Nitranilin getrennt worden. Das Methylorange ist vom Amidoschwarz gut abgesetzt, die Farbstoff-Fronten liegen bis auf die schmale Randzone horizontal.

## DIE ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON HUMANSERUM

Dialysiertes Humanserum wurde mit Gips gesättigt. Wir überzeugten uns, dass das Serum hierbei nicht verändert wird, insbesondere wird an den überschüssigen Gips kein Serumbestandteil adsorbiert.

Nach Beendigung der Elektrophorese (siehe Fig. 6 und Tabelle II) wurde der

TABELLE II

## ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON HUMANSERUM

---

Pufferlösung:	0.1 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Veronal, pH 8.5
Substanzmenge:	26 ml Serum
Startposition:	1.5 cm Tiefe
Spannung:	110 V =
Stromstärke:	1.5 A
Temperatur:	15°
Dauer:	30 St.

---

Gipsblock, dem Abklatsch entsprechend, mit Hilfe eines gebogenen Blechstreifens unterteilt, wobei die zwischen den Proteinzonen liegenden Gipsstücke verworfen wurden. Zur Isolierung des  $\beta$ -Globulins ist zu bemerken, dass dieses aus einem Protein-( $\beta_0$ )- und einem Lipoprotein-( $\beta_L$ )-Anteil besteht. Das durch Ultrafiltration (Filter: Lsg 60, Membranfilter-Ges., Göttingen) von anorganischen Bestandteilen

befreite Protein wird bei der anschliessenden Gefriertrocknung teilweise denaturiert, denn das Lipoprotein geht dann mit Puffer nicht mehr in Lösung (siehe unten). Die Ausbeute der Proteinfractionen betrug:

Albumin 744.2 mg  
 $\alpha_1$ -Globulin 57.9 mg  
 $\alpha_2$ -Globulin 160.5 mg  
 $\beta$ -Globulin 85.3 mg  
 $\gamma$ -Globulin 220.2 mg

Unter der Voraussetzung, dass die in die Elektrophorese-Kammer eingebrachte Serum-Menge 7% Protein enthält (1820 mg), entsprechen die isolierten Proteinfractionen (1268.1 mg) einer Ausbeute von rund 70% des Ausgangsmaterials.

Die Prüfung auf die elektrophoretische Einheitlichkeit der isolierten Fraktionen wurde mit der von uns entwickelten interferometrischen Agar-Zonenelektrophorese<sup>2</sup> vorgenommen. Fig. 7 zeigt das Ergebnis dieser Kontrolle\*. Das oberste

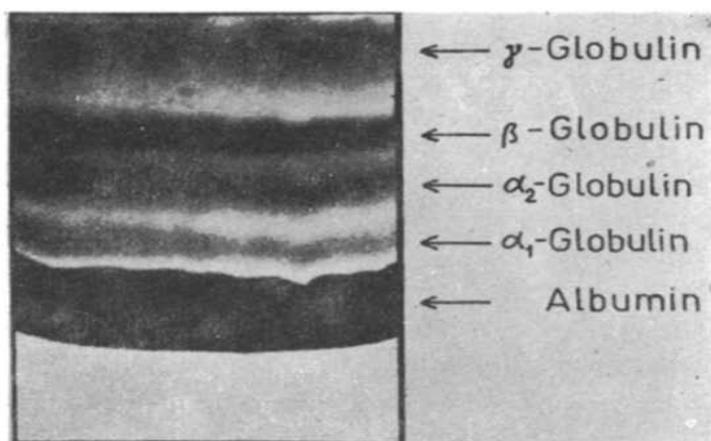


Fig. 6. Angefärbter Abklatsch der Protein-Zonen von Humanserum.

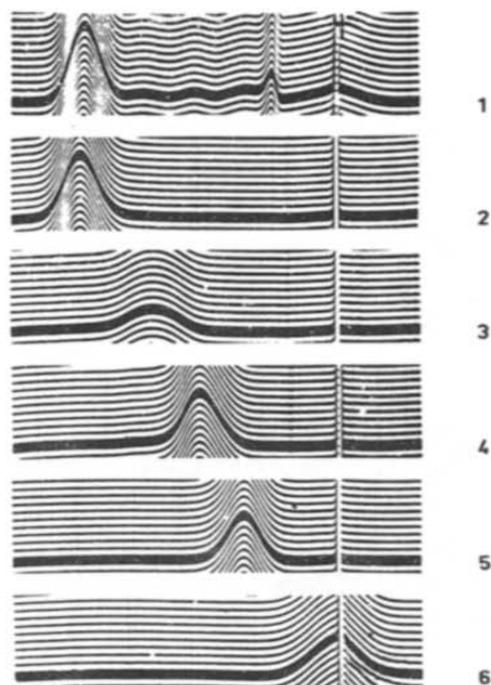


Fig. 7. Analytische Zonenelektrophorese von Humanserum und seinen Protein-Komponenten. (1) Humanserum; (2) Albumin; (3)  $\alpha_1$ -Globulin; (4)  $\alpha_2$ -Globulin; (5)  $\beta$ -Globulin; (6)  $\gamma$ -Globulin.

Diagramm zeigt das Ausgangsserum, von links nach rechts die Gipfel des Albumins,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta_0$ ,  $\beta_L$ -Globulins und den  $\gamma$ -Globulingipfel, welcher infolge der Elektroosmose im Agar-Gel nicht wandert, sondern an der Startstelle, dem Füllkanal stehen bleibt. Wie man sieht, fehlt dem löslichen  $\beta$ -Globulin (Diagramm 5) die im Gesamtserum als steiler Gipfel auffallende Fraktion des  $\beta_L$ -Lipoproteins, welches infolge Denaturie-

\* Zur besseren Kenntlichmachung der Elektrophorese-Ergebnisse wurde auf den Interferenzdiagrammen ein Zwischenraum zwischen zwei Interferenzlinien schwarz ausgezogen; die senkrechte Doppellinie ist der Füllkanal (Startzone).

rung unlöslich geworden ist. Die isolierten Serumfraktionen erweisen sich als elektro-phoretisch einheitlich.

Die Literatur über präparative Elektrophorese-Verfahren ist zwar schon umfangreich — trotzdem entschlossen wir uns, sie um diesen Beitrag zu vermehren, da damit nicht nur ein neuartiges Füllmaterial, sondern auch eine Methodik, die sich unverändert seit vier Jahren bewährt hat, bekannt gemacht werden soll.

#### DANK

An dieser Stelle sei Herrn Dr. W. REUTER für seine Mitwirkung bei den Vorarbeiten, Herrn W. BRUDER für seine Mitarbeit in der Institutswerkstätte, und Herrn D. KÖHLER für die Durchführung der Versuche bestens gedankt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Für die präparative Elektrophorese hat sich reiner Gips als stabilisierendes Füll-Medium bewährt. Die Vorteile dieses Mediums sind darin zu erblicken, dass die Gips-Füllung keine Proteine oder Kohlehydrate adsorbiert, dass mit Gips auch relativ grosse Elektrophorese-Kammern leicht homogen gefüllt werden können, dass die Elektroosmose infolge der weiten Poren des Gipsbetts sehr gering ist, und dass die einzelnen Zonen nach der Beendigung der Elektrophorese durch Zerschneiden der freigelegten Gips-Füllung genau getrennt werden können. Für die Elektrophorese von Stoffen, welche schwer lösliche Sulfate oder Ca-Salze bilden, ist die Gips-Füllung nicht geeignet. Die beschriebene Apparatur gestattet die elektrophoretische Zerlegung von etwa 1 g Substanz in einem Arbeitsgang in guter Ausbeute.

#### SUMMARY

Pure gypsum has proved to be a good stabilizing medium for preparative electrophoresis. The advantages of this medium are that it does not adsorb proteins or carbohydrates, that it can be used to fill relatively large electrophoresis chambers homogeneously, that electro-osmosis is very slight owing to the wide pores of the material and that after completion of electrophoresis the individual zones can be clearly separated by cutting up the gypsum layer. Gypsum cannot be used in the case of substances that form sparingly soluble sulphates or calcium salts. Using the apparatus described it is possible to resolve about 1 g of substance in one operation in good yield.

#### LITERATUR

- 1 W. REUTER, *Biochem. Z.*, 331 (1959) 337.
- 2 W. BOCKEMÜLLER UND A. OERTER, *Klin. Wochschr.*, 39 (1961) 371.

*J. Chromatog.*, 18 (1965) 86-99