

Eine vereinfachte Elektrophoreseeinrichtung für runde Küvetten.

Von
H. Michl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 22. Juli 1950. Vorgelegt in der Sitzung am 12. Okt. 1950.)

Welchen Einfluß die Elektrophorese auf die Eiweißchemie genommen hat, läßt die rasch angewachsene Literatur auf diesem Gebiet erkennen. Ihr Vorteil liegt in der besonders schonenden Arbeitsweise und dem weitgehenden Trenneffekt bei Proteinen auf Grund ihrer verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Dabei gelingt es, die Zahl der einzelnen Komponenten und auch ihre Konzentrationen in einer Operation innerhalb weniger Stunden zu ermitteln. Die Auswirkung auf dem rein analytischen, wie auch auf dem medizinisch-diagnostischen Gebiet¹ sind trotz der kurzen Zeit ihrer Verwendung in einer großen Zahl von Arbeiten erkennbar. Die erzielten Erfolge lassen nun eine allgemeine Anwendung wünschenswert erscheinen, doch steht dem der hohe Anschaffungspreis einer Elektrophoreseeinrichtung entgegen.

Im folgenden wird von Versuchen berichtet, deren Ergebnis eine Vereinfachung und damit eine wesentliche Verbilligung einer Elektrophoreseeinrichtung darstellt.

Der eigentliche Elektrophoreseapparat, also der Teil der Einrichtung, in dem die Proteine wandern, besteht bei den gebräuchlichen Apparaturen aus geschliffenen Küvetten mit *rechteckigem* Querschnitt². Als wesentliche Abänderung gegenüber diesen Apparaturen verwende ich *runde* Küvetten. Diese haben außer ihrer leichten Beschaffbarkeit noch besondere Vorteile,

¹ E. Wiedemann in F. Wuhrmann und Ch. Wunderly, Die Bluteiweißkörper des Menschen. Basel: Benno & Schwabe. 1947.

² A. Tiselius, Kolloid-Z. 85, 129 (1938).

die auf ihrer Zylinderlinsenwirkung beruhen. Im folgenden wird nun einerseits die Elektrophoreseapparatur, andererseits die optische Anordnung beschrieben.

Beschreibung der Elektrophoreseeinrichtung.

I. Elektrophoreseapparatur.

Als Elektrophoreseapparatur dient eine modifizierte *Bennhold*-Apparatur³: Im Prinzip ist sie ein U-Rohr, das durch zwei Glashähne in drei Teile geteilt wird. Die Hahnbohrungen haben den gleichen Durchmesser wie das U-Rohr. Der Fassungsraum des U-Rohres zwischen den beiden Glashähnen, der die zu untersuchende Lösung aufnimmt, ist 6 bis 10 ml. Die beiden Glashähne sind in verschiedenen Höhen angebracht, um beide Schenkel der Elektrophoreseapparatur besser beobachten zu können. Die beiden Enden des U-Rohres tragen dann, wie schon von *Bennhold* angegeben, die Gefäße für die Elektroden und einen Hahn zum Druckausgleich. Außerdem ist die Verbindung zwischen den Elektrodengefäßen und den Enden des U-Rohres kugelförmig erweitert. Dadurch wird auch bei langdauernden Versuchen verhindert, daß Elektrolysenprodukte in das U-Rohr gelangen.

In ähnlicher Weise wären auch die altbekannten Kataphoreseapparate nach *Pauli*, *Michaelis* usw. verwendbar, sofern sie folgenden Anforderungen genügen:

a) Das Glas der Schenkel des U-Rohres muß schlierenfrei sein.

b) Der innere Durchmesser des U-Rohres soll überall etwa 10 mm betragen. Bei dieser Dimensionierung kann man bei einer Thermostaten-temperatur von 20° Feldstärken bis etwa 8 Volt/cm anlegen.

Schließlich sind die üblichen Bedingungen, wie reversible Elektroden (vgl. *Theorell*⁴), zu beobachten.

II. Optischer Teil.

A. Der Strahlengang.

Zum Nachweis der Phasengrenze Eiweißlösung-Puffer verwende ich das Schlierenverfahren nach *Philpot-Svensson*⁵. Dieses in einer Reihe von ausgezeichneten Arbeiten beschriebene und von *Wiedemann*⁶ noch verfeinerte Verfahren ist nämlich grundsätzlich auch für runde Küvetten geeignet, da es nur *senkrechte* Brechungsgefälle darstellt. Ich modifizierte dieses Verfahren nun derart, daß ich mit nur *einer* korrigierten Linse das Auslangen finde. Abb. 1 zeigt den Strahlengang bei Verwendung dieser Anordnung.

³ *H. Bennhold*, Kolloid-Z. **62**, 129 (1933).

⁴ *H. Theorell*, Biochem. Z. **275**, 1 (1935).

⁵ *H. Svensson*, Kolloid-Z. **90**, 141 (1940).

⁶ *E. Wiedemann*, Helv. chim. Acta **30**, 639 (1947).

Der von der Lichtquelle *A* mit dem Kondensator *B* ausgeleuchtete waagrechte Spalt *C* wird von der Linse *H* in ihrer Eigenschaft als „Schlierenkopf“ auf dem „schrägen Spalt“ *G* (Terminologie: *Svensson*⁵) abgebildet. Die Linse *H* bildet ferner den zu beobachtenden Schenkel des U-Rohres vom Elektrophoreseapparat *E* auf der Mattscheibe *K* ab. Der schräge Spalt *G* wird von der Zylinderlinse *J* (waagrechtes Brechungsgefälle) ebenfalls auf der Mattscheibe *K* abgebildet.

B. Die optischen Elemente.

a) Der *waagrechte Spalt* braucht nicht, wie bei Verwendung rechteckiger Küvetten, in seiner ganzen Länge gleichmäßig ausgeleuchtet zu sein. In meinem Fall wirkt ja der runde Schenkel der Elektrophoreseapparatur als Zylinderlinse mit kräftigem negativem Brechungsvermögen (etwa 20 bis 40 Dioptrien). Eine solche bildet zusammen mit der Linse *H*

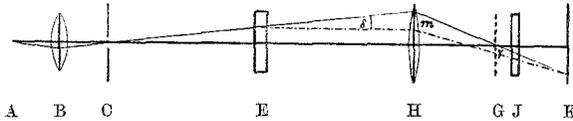


Abb. 1.

jeden Punkt des waagrechten Spaltes als waagrechten Strich ab. Das Bild des waagrechten Spaltes auf dem schrägen Spalt ist damit auf alle Fälle gleichmäßig ausgeleuchtet und genügend lang. Man kann so mit wesentlich kürzeren Spaltöffnungen, zu deren Ausleuchtung jede einfache Projektionslampe an Stelle einer Wolframbandlampe genügt, das Auslangen finden.

b) Der *Thermostat* hat in der Lichtrichtung Fenster aus Planglas. Vor dem Elektrophoreseapparat sind Blenden angebracht, die alles Licht, das nicht durch die Schenkel des U-Rohres geht, abhalten.

c) Die *Linse H* soll zwar möglichst gut korrigiert sein, doch ist wegen des kleinen Bildwinkels kein Anastigmat erforderlich. Besonders geeignet sind aus zwei Fernrohrobjektiven zusammengesetzte Aplanate oder Linsen vom *Petzvaltyp*, wie sie für Projektionszwecke verwendet werden. Die Brennweite muß um 100 cm liegen. Als wirksame Öffnung sind 5 bis 7,5 cm ausreichend. Voraussetzung für die Verwendbarkeit dieses verhältnismäßig kleinen Linsendurchmessers ist allerdings, daß der Strahlengang gegen den Elektrophoreseapparat verschiebbar ist. Dieses bei Elektrophoreseeinrichtungen zum erstenmal geübte Verfahren wird weiter unten beschrieben.

d) Der *schräge Spalt* ist in der Spalttrichtung verschiebbar und außerdem um seinen Schnittpunkt mit dem Bild des waagrechten Spaltes drehbar angeordnet.

e) Als *Zylinderlinse* dient ein aus zwei Einzellinsen zusammengesetztes Periskop.

f) Die *optische Bank* für die gesamte Optik besteht aus einem Stück und ist aus einer Stahlschiene mit U-förmigem Querschnitt angefertigt.

Damit man nun die Vorgänge in beiden Schenkeln der Elektrophoreseapparatur möglichst gut beobachten kann, muß entweder der Durchmesser der für den Schlierenkopf verwendeten Linse entsprechend groß sein (bei den gebräuchlichen Apparaten etwa 10 cm) oder aber der Strahlengang muß gegen die Elektrophoreseapparatur *beweglich* gemacht werden. Theoretisch ist das letztere auf zweifache Art denkbar: Entweder wird die Elektrophoreseapparatur gegen den Strahlengang bewegt, wie von *Svensson*⁵ diskutiert, oder aber der Strahlengang wird gegen die Elektrophoreseapparatur beweglich gemacht. Da es mit einfachen Mitteln nicht möglich ist, die Elektrophoreseapparatur völlig erschütterungsfrei gegen den Strahlengang zu verschieben, griff ich zur zweiten Möglichkeit. Ich ließ also die Elektrophoreseapparatur fest und machte die optische Bank gegen sie beweglich. Diese ist jetzt heb- und senkbar, sowie zur Beobachtung beider Schenkel des U-Rohres waagrecht verschiebbar, was sich auf einfachste Weise bewerkstelligen läßt. Der Aufwand für diese mechanische Anordnung steht in keinem Verhältnis zu dem Mehraufwand für Linsen mit dem sonst notwendigen größeren Durchmesser, von denen ja doch nur ein verhältnismäßig kleiner Teil der wirksamen Öffnung ausgenützt wird.

C. Zustandekommen des Bildes.

Die folgende Überlegung soll den in Abb. 1 skizzierten Strahlenverlauf verdeutlichen. Wenn man den schrägen Spalt und die Zylinderlinse *J* entfernt, sieht man auf der Mattscheibe das verkehrte Bild der Elektrophoreseapparatur, wie es von der Linse *H* entworfen wird. Bringt man jetzt die Zylinderlinse *J* in den Strahlengang, so wird das ursprüngliche Bild in die Breite gezogen. Was früher ein Punkt war, wird eine waagrechte Linie, aus dem zuerst sichtbaren Band wird ein breiteres Rechteck. Die senkrechte Aufeinanderfolge der einzelnen Bildpunkte bleibt aber gewahrt, da ja nur das waagrechte Brechungsgefälle der Zylinderlinse zusätzlich vorhanden ist. Schaltet man schließlich den zunächst senkrecht gestellten schrägen Spalt *G* ein, so zeigt sich auf der Mattscheibe ein scharfes senkrechttes Band. Dieses ist in seiner senkrechten Dimension ein Bild der Elektrophoreseapparatur; in seiner waagrecht Dimension ist es ein Bild des schrägen Spaltes. Verdreht man jetzt den schrägen Spalt, so bleibt, falls sich in dem eingestellten Schenkel der Elektrophoreseapparatur nur eine optisch einheitliche Lösung befindet, das Band als solches bestehen, wenn es auch breiter und unscharf wird. Befinden sich hingegen im Schenkel Stellen, an denen sich der Brechungsquotient

in senkrechter Richtung ändert, etwa eine Grenzfläche Eiweißlösung gegen Puffer, so bildet sich mit wachsendem Winkel des schrägen Spaltes gegen die Senkrechte eine Zacke aus. Diese Zacke ist nichts anderes als die graphische Darstellung des Differentialquotienten dn/dx (n = Brechungsquotient, x = Höhe des Schenkels), also der Änderung des Brechungskoeffizienten des Schenkelinhaltes mit der Höhe. Ihre Entstehung soll Abb. 2 verdeutlichen.

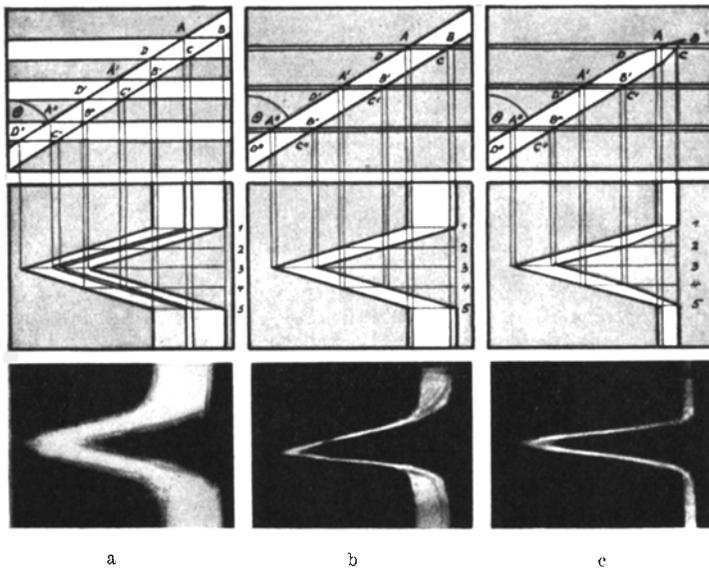


Abb. 2.

In Abb. 2a sehen wir oben den schrägen Spalt, der den Winkel θ mit der Senkrechten einschließt. Auf ihn fällt das Bild des waagrechten Spaltes. Von diesem wird nur ein parallelogrammförmiger Lichtfleck $ABCD$ durchgelassen. Die Zylinderlinse bildet diesen Lichtfleck nur in der waagrechten Dimension ab, er erscheint daher auf der Mattscheibe als senkrecht gerades Band (Abb. 2a, senkrechte gerade Teile). Befindet sich im Schenkel der Elektrophoreseapparatur eine Grenzfläche, also ein senkrecht Brechungsgefälle, so werden die Lichtstrahlen, die dort durchgehen, gekrümmt. Man wird also auf dem schrägen Spalt außer dem normalen Spaltbild $ABCD$ noch andere Spaltbilder ($A'B'C'D'$) bekommen. Diese sind dem normalen parallel, jedoch senkrecht verschoben, und zwar meist nach unten. Dadurch schneiden sie den schrägen Spalt *seitlich* unter dem Schnitt des normalen Spaltbildes. In Abb. 2 ist der Schnitt des Spalt-

bildes mit dem schrägen Spalt mit $ABCD$ bezeichnet, als Schnittpunkt der abgelenkten Spaltbilder ist z. B. $A'B'C'D'$ herausgegriffen. Je stärker also ein Strahl gekrümmt wird, desto weiter seitlich verschoben wird er den schrägen Spalt schneiden, und desto höher wird der entsprechende Teil der 'Zacke' ausfallen. In Abb. 2 wird diese Wirkung des schrägen Spaltes durch die senkrechten Ordner angedeutet. Die „richtige“ senkrechte Aufeinanderfolge der einzelnen Bildpunkte, also die in dieser Richtung vorhandene Abbildung der Elektrophoreseapparatur durch die Linse H , wird mit den Zahlen 1, 2, 3 usw. schematisiert. Die Zacke wird also um so höher sein:

1. Je weiter die abgelenkten Bilder des waagrecht Spaltes auseinanderliegen. Dies hängt ab:

a) Von dem Durchmesser des lichtdurchflossenen Schenkels der Elektrophoreseapparatur, also von der Dicke der durchstrahlten Schicht.

b) Von der Größe des Brechungsgefälles. Dieses hängt wieder ab von dem Brechungsquotienten der beiden Phasen und von der Schärfe der Grenzschicht selbst.

c) Von der „wirksamen“ Entfernung der Elektrophoreseapparatur vom schrägen Spalt. Als „wirksame“ Entfernung l definiert man jene Entfernung^{1, 5}, die bei Abwesenheit der Linse H zwischen der Elektrophoreseapparatur und dem schrägen Spalt vorhanden sein müßte, um die gleiche Ablenkung zu erzielen wie bei Anwesenheit der Linse H .

Der mathematische Ausdruck für sie lautet⁵:

$$l = y/\delta.$$

y ist die Entfernung zwischen dem normalen Spaltbild und dem abgelenkten auf dem schrägen Spalt.

δ ist der Lichtablenkungswinkel in der Elektrophoreseapparatur, also der Winkel zwischen einem nicht abgelenkten und einem abgelenkten Strahl (vgl. Abb. 1: der nicht abgelenkte Strahl ist voll ausgezogen, der abgelenkte Strahl ist strichpunktiert). δ ist so klein, daß die Tangente durch den Bogen ersetzt werden darf.

Ein zweiter Ausdruck für δ ergibt sich zu⁵:

$$\delta = m/\overline{EH}.$$

m ist die Entfernung zwischen den Durchstoßpunkten des nicht abgelenkten und des abgelenkten Strahles durch die Linse H .

Aus Abb. 1 ergibt sich ferner:

$$m : y = \overline{HK} : \overline{GK}.$$

Aus diesen drei Gleichungen und der Reziprokenformel von H gewinnt man für l folgenden Ausdruck:

$$l = \overline{EH} - \overline{CH} \frac{\overline{EH} - f_H}{\overline{CH} - f_H}.$$

f_H ist die Brennweite der Linse H .

2. Die Zacke ist ferner um so höher, je größer der Winkel ist, den der schräge Spalt mit der Senkrechten einschließt und

3. je stärker die Abbildung des schrägen Spaltes auf der Mattscheibe vergrößert ist.

$1a$ und $1c$ sind Apparatkonstante. $1b$ hängt vom untersuchten System ab. Um eine ausreichende Empfindlichkeit zu erzielen, die Zacke also hoch genug werden zu lassen, bleibt, da $1a$ und $1c$ vorgegeben sind, nur mehr die in Punkt 2 angeführte Möglichkeit. Punkt 3 bewirkt keine Erhöhung der Empfindlichkeit, da ja auch die Bandbreite mitvergrößert wird. Aber auch nach Punkt 2 kann man nicht, wie erwünscht, den schrägen Spalt beliebig weit verdrehen, da das Lichtband sonst zu breit und unscharf würde. Es werden nämlich die Parallelogramme, die beim Schnitt der Bilder des waagrechten Spaltes und des schrägen Spaltes entstehen (Abb. 2, $ABCD\dots$) mit wachsendem Winkel des schrägen Spaltes mit der Senkrechten immer flacher. Ich nenne nun den *mittleren gleichmäßig hell ausgeleuchteten* Teil des Lichtbandes *Kernbreite*. Für sie errechnet sich, wenn die Abbildung des schrägen Spaltes auf der Mattscheibe in natürlicher Größe erfolgt, der Ausdruck:

$$b/\cos \theta,$$

worin b die Breite des schrägen Spaltes ist. Auf beiden Seiten dieser Kernbreite sinkt die Lichtstärke linear auf 0 ab. Ich nenne diesen Teil des Bandes *Verlaufbreite*, deren Größe gleich

$$a \operatorname{tg} \theta$$

ist, wobei a die Breite des waagrechten Spaltes und des Spaltbildes bedeutet, wenn, wie hier angenommen wird, seine Abbildung in natürlicher Größe erfolgt.

Mit zunehmendem Winkel des schrägen Spaltes gegen die Senkrechte wird die Verlaufbreite immer größer und die Kernbreite immer kleiner. Von Beugungserscheinungen, die sich besonders bei großem Winkel θ und kleiner Breite des schrägen Spaltes bemerkbar machen können, wird hier abgesehen. Nun erscheinen Konturen auf Photographien oder auf der Mattscheibe nur dann als scharf, wenn ihre Verlaufbreite kleiner als 0,1 mm ist. Erfahrungsgemäß kann man mit der Spaltbreite des waagrechten Spaltes kaum unter 0,1 mm heruntergehen. Setzt man diesen Wert in die oben angegebene Formel für die Verlaufbreite ein, so sieht man, daß man nur bei Winkeln des schrägen Spaltes bis 45° scharfe Bilder erhalten kann. Es gibt nun folgende Möglichkeiten, eine

zu große Verlaubbreite zu verkleinern und so mit größeren Winkeln θ des schrägen Spaltes arbeiten zu können.

1. Man entwickelt Negativ und Positiv möglichst hart; dieser Weg wird mehr oder weniger bewußt allgemein angewendet.

2. In demselben Sinne wirkt sich auch eine *Verkleinerung* der Breite a des Bildes des waagrechten Spaltes aus, wie man aus der Formel für die Verlaubbreite ersieht. Auch aus der Gegenüberstellung von Abb. 2a und 2b kann man erkennen, wie günstig sich eine Verkleinerung des waagrechten Spaltes auswirkt. Man kann, wie oben erwähnt, den waagrechten Spalt nicht beliebig schmal machen. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, verwende ich an Stelle eines materiellen Spaltes sein verkleinertes, virtuelles Bild. Dieses wird durch einen kurzbrennweitigen Anastigmaten zwischen dem waagrechten Spalt und der Elektrophoreseapparat-ur erzeugt. Da das virtuelle Bild des Spaltes nicht nur verkleinert, sondern auch verkürzt wird, ist diese Spaltverkleinerung nur bei runden Küvetten möglich. Hier verhindert nämlich die Zylinderlinsenwirkung der runden Küvetten, daß das entstehende Spaltbild zu kurz wird. Die Spaltverkleinerung bewährt sich besonders bei Strahlengängen mit mehreren korrigierten Linsen, wie sie in den Apparaturen von *Svensson*⁵ und *Wiedemann*¹ benutzt werden, sofern man runde Küvetten verwendet.

Angestrebt wird ferner ein in seiner ganzen Ausdehnung *gleichmäßig breites* Bild, wie es Abb. 2c zeigt. Zu diesem Zwecke muß die Basislinie ebenso schmal gemacht werden wie die anderen Teile des Bildes. Dies erreicht man z. B. dadurch, daß man den schrägen Spalt in eine Spitze auslaufen läßt⁵. Hierbei ist die Form der Spitze von großer Wichtigkeit. Ließe man z. B. den Spalt symmetrisch in die Spitze auslaufen, so ergäbe sich bei starker Verdrehung des schrägen Spaltes eine Verschiebung der Basislinie. Mit Hilfe der in Abb. 2 gezeigten graphischen Darstellung ist es möglich, die günstigste Spaltform zu ermitteln. Es ergab sich als solche eine asymmetrische Keilform, die auch in meiner Apparatur verwendet wird. Die Photographien in Abb. 2 unten zeigen die Wirkung der Spaltverkleinerung und die der Verengung der Spitze.

Die beschriebene Elektrophoreseeinrichtung hat sich bisher in zahlreichen klinischen Serum- und Plasmauntersuchungen sowie bei Einheitlichkeitsprüfungen von Proteinen und Polypeptiden bewährt⁷.

Zusammenfassung.

Es wird eine Elektrophoreseeinrichtung beschrieben, die sich in folgenden Punkten von den gebräuchlichen unterscheidet:

⁷ Z. B. *L. Schmid, H. Michl* und *G. Zwettler*, Mh. Chem. 81, 198 (1950); weitere Arbeiten im Druck.

1. Statt rechteckiger Küvetten werden *runde* verwendet. Diese ermöglichen die Verwendung kurzer, waagrechter Spalte, zu deren Ausleuchtung eine einfache Projektionslampe genügt.

2. Durch Verwendung einer *optischen Verkleinerung* des waagrechten Spaltes können große Winkel des schrägen Spaltes verwendet werden.

3. Die optische Bank ist gegen die Elektrophoreseapparatur *beweglich* angeordnet; dadurch ist es möglich, Linsen kleinen Durchmessers zu verwenden.

4. Es wird ein Strahlengang mit nur *einer* korrigierten Linse beschrieben.

5. Es wird eine graphische Methode zur Ermittlung der *günstigsten Form* des *schrägen Spaltes* angegeben.