

Über die Zonenelektrophorese von Proteinen bei erhöhten Spannungsgefällen¹.

Von
H. Michl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 8 Abbildungen.

(Eingelangt am 24. Juli 1954.)

Es werden Störungen, die bei der Papierelektrophorese von Proteinen bei Spannungsgefällen bis etwa 20 V/cm auftreten, besprochen und Versuchsanordnungen angegeben, die diese vermeiden. Für die Untersuchung empfindlicher Proteine bei höheren Spannungsgefällen (bis 50 V/cm) wird eine Anordnung zur Elektrophorese in dünnen Stärkeplatten beschrieben.

Die Papierionophorese bei erhöhtem Spannungsgefälle, wie sie seinerzeit vom Verfasser vorgeschlagen wurde², hat sich hauptsächlich bei der Auftrennung von niedrigmolekularen Substanzen bewährt³. Auch Proteine sind bei höheren Spannungsgefällen untersucht worden⁴. Dabei

¹ Nach einem Vortrag im Verein Österreichischer Chemiker und der Österreichischen Biochemischen Gesellschaft am 5. III. 1954.

² H. Michl, Mh. Chem. **82**, 489 (1951).

³ Z. B. Aminosäuren und Peptide: L. Schmid, H. Michl und G. Zwettler, Mh. Chem. **82**, 526 (1951). — B. Kickhöfen und O. Westphal, Z. Naturforsch. **7 b**, 655, 659 (1952). — L. Bilek, J. Derkosch, H. Michl und F. Wessely, Mh. Chem. **84**, 717 (1953). — H. Truppy und H. Michl, ebenda **84**, 1011 (1953). — H. Michl und H. Kuhn, Fachl. Mitt. d. Österr. Tabakregie **1954**, 10. — Kohlenhydrate: H. Michl, Mh. Chem. **83**, 737 (1952). — Y. Hashimoto, I. Mori und M. Kimura, Nature **170**, 976 (1952). — D. Gross, ebenda **172**, 908 (1953); **173**, 487 (1954). — Purine: W. C. Werkheiser und R. J. Winzler, J. Biol. Chem. **204**, 971 (1953). — F. Turba, H. Pelzer und H. Schuster, Z. physiol. Chem. **296**, 97 (1954). — H. Michl und F. Haberler, Mh. Chem. **85**, 779 (1954). — H. Michl und H. Kuhn, Fachl. Mitt. d. Österr. Tabakregie **1954**, 14.

⁴ H. Michl, Mh. Chem. **82**, 944 (1951); **83**, 210 (1952). — H. Michl, K. Riedl und F. Wessely, ebenda **82**, 539 (1951). — H. Sterz und W. Klementschitz, Wien. klin. Wschr. **64**, 103 (1952).

wurden fast die gleichen Apparaturen und Kühlvorrichtungen, wie sie zur Trennung der niedrigmolekularen Substanzen Verwendung fanden, benützt. Diese Verfahren ergaben meist nur bei verhältnismäßig einfachen Proteingemischen (Serum, Hühnereiweiß) brauchbare Resultate. Bei komplizierten Gemischen treten verschiedene Fehlerquellen in Erscheinung, die sich prinzipiell nicht beseitigen lassen. Eine solche sind z. B. die Kühlvorrichtungen, seien es Flüssigkeiten oder Feststoffe. Zwischen der Oberfläche des Filtrierpapierstreifens und der Kühlfläche befindet sich nämlich meist ein Pufferfilm, in dem andere Wanderungsbedingungen herrschen als im Inneren des Streifens. Die Folge davon waren Verbreiterungen und Verschmierungen der Zonen. Bei niedrigmolekularen Substanzen konnte man sich dadurch helfen, daß man relativ trockene Filtrierpapierstreifen verwendete (Benetzungsgrad 100%), so daß es erst gar nicht zur Ausbildung eines Pufferfilmes kam. Bei Proteinen war das nicht möglich, da sie vom Filtrierpapier zu stark zurückgehalten wurden. Man benötigt also eine Versuchsanordnung, die die Verwendung frei hängender — nur von Gasen bzw. Luft umgebener — Filtrierpapierstreifen bei erhöhtem Spannungsgefälle gestattet.

Den Vorteilen eines Zeitgewinnes, einer günstigeren Ausbeute und einer eventuell besseren Auftrennung eines solchen Verfahrens steht der Umstand entgegen, daß bei der Erhöhung des Spannungsgefälles die Wanderungsgeschwindigkeit linear, die erzeugte *Joulesche* Wärme und damit die verdunstete Puffermenge quadratisch wächst.

Spannungsgefälle und Pufferströmungen in einem frei-hängenden Filtrierpapierstreifen.

Im folgenden soll nun genauer gezeigt werden, warum die Papier-electrophorese bei erhöhten Spannungsgefällen in einer normalen feuchten Kammer keine befriedigenden Resultate ergeben kann. Abb. 1 zeigt den Verlauf eines derartigen Versuches für Teilchen mit einer elektro-phoretischen Beweglichkeit von $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec.}^{-1}$. Im einzelnen wurde bestimmt: 1. Die Geschwindigkeit, die die Teilchen unter dem Einfluß des elektrischen Feldes allein hatten (I—3). 2. Die Geschwindigkeit, die sie durch die Pufferströmung bekamen (I—III). 3. Die Resultierende aus beiden (a—c).

Zu 1. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ist proportional dem Spannungsgefälle. Dieses war in der Streifenrichtung überall gleich groß und änderte sich anfangs nur wenig. Erst gegen Ende des Versuches beobachtete man ein langsames Absinken des Spannungsgefälles in der Mitte des Streifens. Dies war auf das Abdampfen des Wassers, Nachströmen des Puffers und die dadurch erhöhte Puffer-

konzentration zurückzuführen. Zu den gleichen Ergebnissen ist Pučar⁵ gekommen, der sehr sorgfältige Untersuchungen im Gleichstromfeld unter den verschiedensten Bedingungen angestellt hat.

Zu 2. Die Pufferströmungen konnte man dadurch studieren, daß man auf einen Filtrierpapierstreifen in gleichen, regelmäßigen Abständen Striche einer Testsubstanz aufbrachte. Die Wahl dieser hing von der verwendeten Stromart ab: Im Gleichstromfeld benützte man Substanzen,

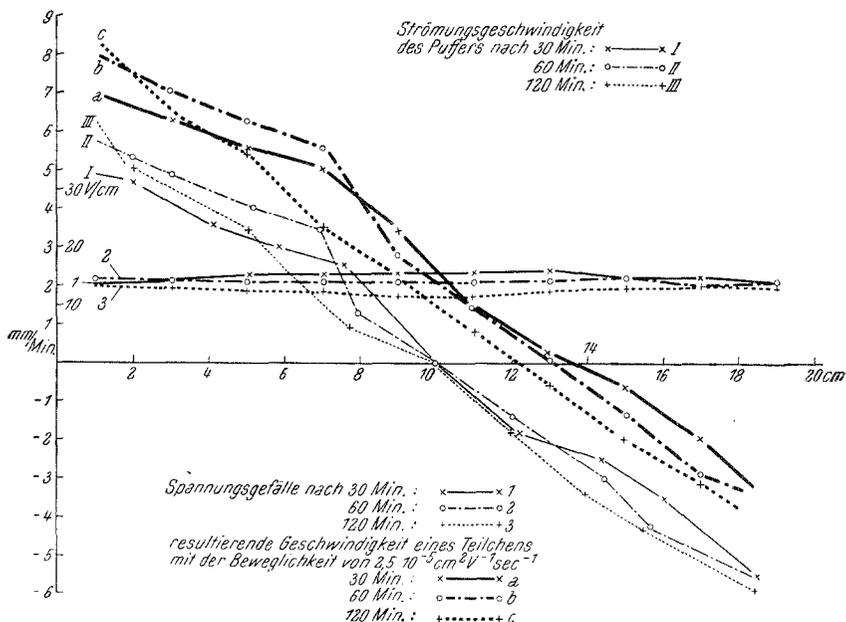


Abb. 1. Filtrierpapierstreifen SS 2043 b glatt, 4mal 21 cm; Veronalpuffer pH 8,7; $\mu = 0,03$; Spannung 300 V; Stromstärke nach 30 Min. 3,4 mA, 60 Min. 3,7 mA, 120 Min. 4,2 mA.

die im Strom nicht wandern, etwa Zucker. Im Wechselstromfeld ließen sich Farbstoffe verwenden. Das hatte den Vorteil, daß man den Einfluß der Pufferströmung direkt beobachten konnte und daß der elektroosmotische Effekt ausgeschaltet war.

Wie Abb. 1 zeigt, waren die Pufferströmungen an den Enden des Filtrierpapierstreifens am stärksten, gegen die Mitte zu sanken sie allmählich auf Null ab. Zu Beginn der Versuche waren die Strömungen schwächer, da der Filtrierpapierstreifen von der Befeuchtung her noch genügend Puffer enthielt und das Nachströmen aus den Puffergefäßen erst bei einer bestimmten Trockenheit eintrat. Mit zunehmender Austrocknung verstärkte sich die Strömung, bis schließlich ein Gleichgewicht eintrat. In diesem Zustand war die Pufferströmung, besonders in den

⁵ Z. Pučar, Arhiv za kemiju 25, 205 (1953); 26, 29, 41 (1954).

Randgebieten, wesentlich größer als die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen im elektrischen Strom.

Zu 3. Wenn man nun die Resultierende (stark ausgezogen) aus der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und der Strömungsgeschwindigkeit des Puffers beobachtet, sieht man, daß beide zunächst gleichsinnig wirkten. Gegen die Mitte zu wurde der Einfluß der Pufferströmung immer kleiner, schließlich drehte er sein Vorzeichen um und wirkte der elektrophoretischen Wanderung entgegen, bis beide gleich groß waren, aber ein entgegengesetztes Vorzeichen hatten. Dieser Punkt ist durch den Schnitt der Resultierenden mit der Abszisse gekennzeichnet. Eine Wanderung der Substanz über diese Stelle hinaus war also nicht mehr möglich, die optimale Auftrennung war erreicht. Bei einer weiteren Verlängerung der Versuchsdauer verschob sich durch das Absinken des elektrischen Feldes diese Stelle langsam zur Mitte zu. Die Auftrennung wurde dadurch wieder schlechter. Man begegnete hier also den gleichen Verhältnissen wie bei der Elektrophorese⁶. Pufferströmungen, wie sie hier beschrieben worden sind, treten auch bei der Verwendung niedriger Spannungsfälle auf, ihr Einfluß wurde meist vernachlässigt.

Zonenelektrophorese in Filtrierpapier.

Es gibt nun grundsätzlich folgende Möglichkeiten, diese Störungen zu beseitigen:

1. Man verhindert das Entstehen *Joulescher* Wärme überhaupt.
2. Die *Joulesche* Wärme wird durch Leitung oder Strahlung abgeführt.
3. Die Kühlung erfolgt wohl durch Verdunsten des Pufferlösungsmittels, dieses wird jedoch so ersetzt, daß keine Störungen entstehen.
4. Man nimmt die Pufferströmung in Kauf, doch lenkt man sie so, daß sie die elektrophoretische Trennung nicht behindert.

Zu 1. Diese Möglichkeit wäre eigentlich die ideale. Es wurde versucht, ihr dadurch nahe zu kommen, daß man Puffer mit langsam wandernden Ionen verwendete. Als solche kamen hochmolekulare Substanzen (part. hydrolysierte Proteine oder Kunststoffe) oder niedermolekulare Ampholyte in der Nähe des isoelektrischen Punktes (z. B. Aminosäuren) in Frage. Die Ergebnisse waren unbefriedigend.

Es wurde ferner versucht, an der Stelle einer kontinuierlichen Gleichspannung Impulse verschiedener Frequenzen, Tastverhältnisse und Formen zu verwenden^{7, 8}. Die Ergebnisse waren in keinem Falle deutlich

⁶ M. Macheboeuf, P. Rebeyrotte, J. M. Dubert und M. Brunerie, Bull. soc. chim. biol. **35**, 334 (1953).

⁷ W. Mach und R. Geffert, Arzneimittelforsch. **3**, 534 (1953).

⁸ Herrn Ing. H. Stricker sei für seine Hilfe bei diesen Versuchen an dieser Stelle gedankt.

besser, als es bei der Verwendung eines gewöhnlichen Gleichstromes mit gleicher effektiver Spannung der Fall war.

Zu 2. Die Ableitung der Wärme kann durch feste, flüssige oder gasförmige Stoffe erfolgen. Bei der Verwendung von festen oder flüssigen Stoffen ließ sich die Pufferströmung z. B. durch Verwendung von Zellophanbarrieren⁹ völlig unterdrücken. Man erhielt jedoch bei der Untersuchung komplizierter Proteingemische, wie eingangs besprochen, eine unerwünschte Verbreiterung der Zonen. Gasförmige Kühlmittel hatten leider bei normalem Druck eine zu geringe Wärmeleitfähigkeit; sogar bei der Verwendung von Wasserstoff¹⁰ in einer kleinen, gekühlten feuchten Kammer rechtfertigten die Ergebnisse nicht den Aufwand.

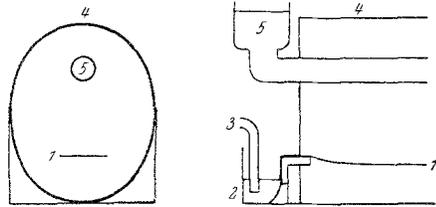


Abb. 2.

Die Abführung der Wärme durch Strahlung sollte die folgende Anordnung (Abb. 2) erleichtern: In den Brennlinsen einer elliptischen Röhre befanden sich der Filterpapierstreifen und ihm gegenüber eine Röhre mit Trockeneis-Aceton. Durch diese Anordnung sollten die „Kältestrahlen“ (Pohl¹¹) im Filterpapierstreifen gesammelt werden. Der Effekt war leider gering, er müßte mit anderen Methoden kombiniert werden.

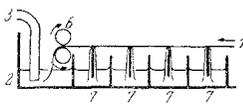


Abb. 3.

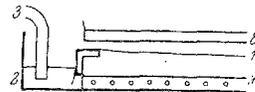


Abb. 4.

Abb. 2-4. 1 Filterpapierstreifen; 2 Puffergefäß; 3 Stromschlüssel; 4 elliptisches Blechröhre; 5 Aceton und Trockeneis; 6 rotierende Walzen; 7 Filterpapierdochte; 8 Wanne mit Aceton-Trockeneis; 9 Kupferschlange mit Wasser von 95°.

Zu 3. Bei dieser Methode wird die Kühlung durch Verdunsten des Pufferlösungsmittels erreicht. Das Problem lag darin, die verdunstete Flüssigkeit so zu ersetzen, daß keine Pufferströmungen auftreten können. Das wurde versucht durch

a) Zufuhr des Puffers durch eine Anzahl Dochte (Abb. 3), die normal zur Längsrichtung des Filterpapierstreifens in Abständen von etwa 2 cm angebracht waren. Um lokale Verschwemmungen zu vermeiden, verrückte man den Streifen während der Versuchsdauer mechanisch

⁹ H. Michl, Mh. Chem. 83, 737 (1952).

¹⁰ H. J. McDonald, J. Chem. Educat. 29, 428 (1952).

¹¹ R. W. Pohl, Einführung in die Optik, S. 281. Berlin. 1941.

um eine Dochtbreite. Diese Anordnung ergab deutlich schärfere Auftrennungen als eine solche mit Kühlflächen. Die Zufuhr des Puffers durch eine größere Anzahl Kapillaren oder durch poröses Material gab unbefriedigende Ergebnisse.

b) Als nächstes versuchte man, die Flüssigkeitszufuhr durch Einbringen des Streifens in ein Aerosol zu bewirken. Man besprühte den Streifen fortlaufend mit einer Spritzpistole oder brachte ihn in den Nebel eines Inhalationsapparates. Besonders im ersten Fall war es schwierig, zu erreichen, daß die Flüssigkeitsteilchen gleichmäßig vom

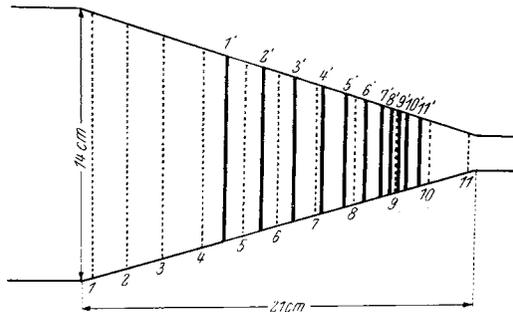


Abb. 5. Filterpapier SS 2043 b glatt, $\frac{1}{4}$ der nat. Größe; Veronalpuffer pH 8,7; $\mu = 0,03$; Spannung 300 V; Stromstärke 8,4 mA (nach 120 Min.); Versuchsdauer 120 Min.
1, 2... Zuckerstreifen zu Beginn, 1', 2'... Zuckerstreifen am Ende des Versuches.

Filterpapier aufgenommen wurden und keine Verschwemmungen eintraten.

c) Schließlich versuchte man, den Filterpapierstreifen in eine stehende Nebelkammer¹² (Abb. 4) einzuhängen. Hierbei brachte man den Streifen normal zu seiner Fläche in ein starkes Temperaturgefälle, wobei sich oben eine mit Aceton-Trockeneis gekühlte Fläche und unten auf 95° erwärmtes Wasser befand. Bei diesem Temperaturgefälle trat naturgemäß eine kräftige Nebelbildung ein, die zu starke Flüssigkeitsverluste auf dem Filterpapierstreifen verhinderte. Eine zu starke Vereisung auf der Unterseite der Kühlfläche mußte vermieden werden. Holt et al.¹³ beschrieben eine Apparatur, die auf einem ähnlichen Prinzip beruht; das Temperaturgefälle ist jedoch wesentlich kleiner und entsprechend weniger wirksam. Es wurde schließlich empfohlen, den Dampfdruck im Filterpapierstreifen durch Zusatz von Glykol, Glycerin oder ähnlichen Stoffen herabzusetzen¹⁴. Dieses Verfahren hat sich für die Untersuchung empfindlicher Proteine nicht sehr bewährt, da diese zum

¹² P. Harteck und G. Hertz, Naturwiss. **39**, 206 (1952).

¹³ C. V. Holt, K. D. Voigt und K. Gaede, Biochem. Z. **323**, 345 (1952).

¹⁴ L. Durrum, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 4875 (1951).

Teil ausgefällt oder durch die höhere Temperatur im Streifen denaturiert werden können.

Zu 4. Die einfachste Lösung gelang dadurch, daß man die Pufferströmung und die elektrophoretische Wanderung während des ganzen Versuches gleichsinnig wirken ließ. Das war durch die Anwendung eines ungleich breiten Streifens — etwa in der Form eines Trapezes mit aufgesetzten Rechtecken — möglich (Abb. 5). Die Austestung der Strömungsverhältnisse mit den parallelen Zucker- bzw. Farbstoffstreifen (Abb. 5) zeigte, daß diese bei richtiger Wahl der Dimensionen vom

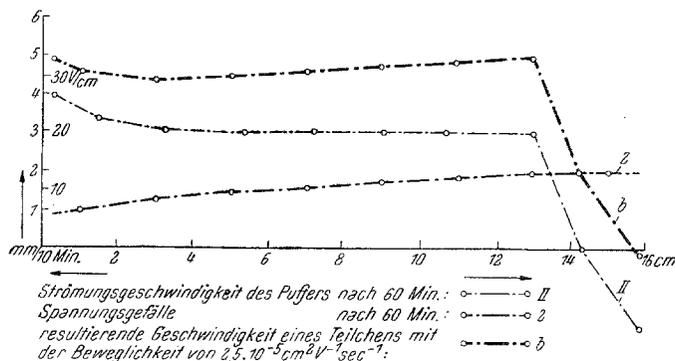


Abb. 6. Papier, Format, Puffer und elektrische Daten wie Abb. 5. Versuchsdauer 60 Min. (7,4 mA).

breiteren Teil des Streifens nahezu in gleicher Entfernung zum schmäleren wandern. Die quantitativen Verhältnisse gibt Abb. 6 wieder. Wie man sieht, verlief während der ganzen Versuchszeit die Pufferströmung im Arbeitsbereich praktisch mit gleicher Geschwindigkeit. Das Spannunggefälle war nicht mehr an allen Stellen gleich, sondern stieg gegen das schmale Ende des Streifens zu an. Im Idealfall müßte es der Gleichung

$$\frac{du}{dx} = \frac{U}{a^2} x$$

(U = gesamte, am Streifen mit der Länge a liegende Spannung, a = Höhe des Trapezes) folgen. Auch die Resultierende zeigte einen Anstieg. Das hatte den Vorteil, daß die schnelleren Teilchen in ein stärkeres Spannunggefälle gelangen, als die langsameren, wodurch die Auftrennung rascher als in einem homogenen Feld erfolgte. Ein weiterer Vorteil war der, daß man, da der Ausgangspunkt des Versuches normalerweise am breiten Ende liegt, verhältnismäßig viel Substanz auftragen kann. Wanderten dann die Komponenten zu schmäleren Stellen, so waren sie schon so weit aufgetrennt, daß keine Störungen durch zu hohe Konzentrationen mehr zu befürchten waren. Aus dem gleichen Grunde störten auch Verunreinigungen durch Salze usw. weniger. Die gewählten

Dimensionen waren von den näheren Versuchsbedingungen (Spannungsgefälle, Pufferkonzentration) abhängig. Im allgemeinen mußte die Verjüngung ziemlich kräftig sein. Man könnte nun glauben, daß die Anwendung eines geschlossenen Kreises im Sinne der Ringpapierchromatographie besonders günstig wäre, doch war dies bei analytischen Untersuchungen nicht der Fall. Für präparative Zwecke bei Verwendung von

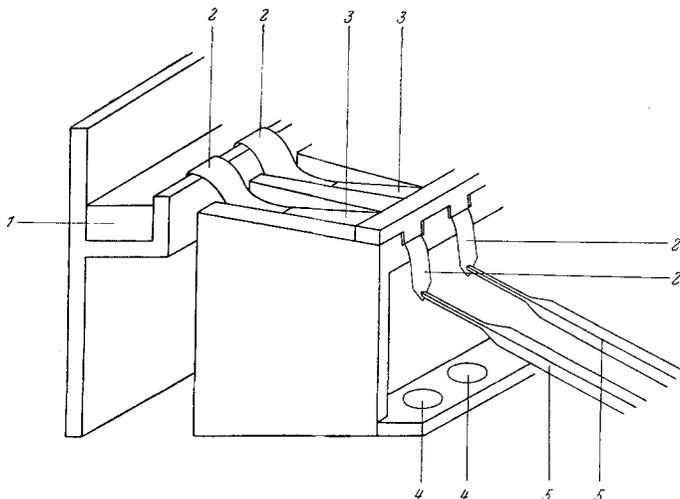


Abb. 7. $\frac{1}{2}$ der nat. Größe. 1 Dest. Wasser, Puffer ö. ä.; 2 Filtrierpapierstreifen (WB 28); 3 Stärke, 4 halbkugelförmige Ausnehmungen; 5 Kapillaren.

kreisförmigen Filtrierpapierscheiben von etwa 40 cm Durchmesser mag diese Anordnung gewisse Vorteile bieten.

Die Papierelektrophorese mit dem trapezförmigen Streifen bewährte sich vor allem zur Auftrennung komplizierter Proteingemische (Enzyme der Tabakblätter, Schlangengifte), da während der kurzen Versuchsdauer — 2 bis 3 Stdn. — die Verluste an biologischer Aktivität kleiner waren als bei der Papierelektrophorese bei niedrigen Spannungen. Die Wiedergewinnung der aufgetrennten Substanzen erfolgte durch Eluieren des zerschnittenen Streifens¹⁵. Eine quantitative Auswertung des angefärbten Diagrammes konnte durch Zerschneiden und Eluieren des Farbstoffes nach *Turba* und *Enekel*¹⁶ oder *Cremer* und *Tiselius*¹⁷ erfolgen. Es ist zwar grundsätzlich auch eine Auswertung mit lichtelektrischen Instrumenten oder mit der Zylinderlinsen-Graukeil-Methode möglich, doch ist dazu die Verwendung eines zusätzlichen Keiles erforderlich.

¹⁵ *F. Sanger* und *H. Tuppy*, *Biochemic. J.* **49**, 463 (1915).

¹⁶ *F. Turba* und *H. J. Enekel*, *Naturwiss.* **37**, 93 (1950).

¹⁷ *H. D. Cremer* und *A. Tiselius*, *Biochem. Z.* **320**, 273 (1950).

Zonenelektrophorese in Stärke.

Bei manchen Enzymen (z. B. Schlangengiftprotease), vor allem aber bei huminartigen Substanzen aus Tabakblättern, gelang es trotz allen Bemühungen nicht, Ausbeuten von mehr als 10 bis 15% zu erhalten und Adsorptionserscheinungen zu vermeiden. Es erwies sich also als notwendig, nach einem anderen Medium zur Stabilisierung des Puffers zu suchen. Als solche bewährte sich die schon von *Kunkel* und *Slater*¹⁸ empfohlene Kartoffelstärke. Diese wurde jedoch nicht, wie bisher beschrieben, in Form dicker Blöcke zur Anwendung gebracht, sondern wir gossen sie in einer dünnen Schicht auf Glasplatten. Solche Platten ließen sich gut handhaben, sie konnten leicht gekühlt werden und erlaubten deshalb die Verwendung entsprechend höherer Spannungsgefälle (bis etwa 50 V/cm). Die einzelnen Komponenten lokalisierte man entweder durch Mitlaufenlassen eines Farbstoffes, der eine Komponente anfärbt, oder nach der Beendigung des Versuches durch Abklatschen mit einem feuchten Filtrierpapier und Anfärben desselben. Die Eluierung erfolgte durch Absaugen, Zentrifugieren oder langsames Durchsaugen des Lösungsmittels. Abb. 7 zeigt eine Anordnung für letztere Möglichkeit. Mit diesem Verfahren konnten wir¹⁹ — wie an anderer Stelle ausführlich berichtet werden wird — Ausbeuten bis zu etwa 70% der biologischen Aktivität erhalten.

Experimenteller Teil.

Bestimmung des Spannungsgefälles: Mit Pt-Spitzen oder kleinen Stromschlüsseln und rev. Elektroden (Ag/AgCl) griff man Abstände von 2 cm ab und bestimmte mit ausreichender Genauigkeit die Spannungsdifferenz mit einem hochohmigen Voltmeter.

Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit: Auf gleichmäßig 4 cm breiten bzw. trapezförmigen (Maße wie Abb. 5) Filtrierpapierstreifen SS 2043 b glatt zeichnete man alle 2 cm Bleistiftstriche normal zur Längsrichtung. Dann zog man sie durch eine Pufferlösung und spannte sie in eine feuchte Kammer aus Plexiglas (4 × 15 × 20 cm). Nach 10 Min. brachte man auf die Bleistiftzeichen Striche mit Bromphenolblaulösung auf und legte eine Wechselspannung von etwa 300 V_{eff.} an. Wollte man nun die mittlere Strömungsgeschwindigkeit nach 30 Min. messen, so bestimmte man die Lage der Farbstriche nach 25 und 35 Min. mit Hilfe eines Diopters und errechnete aus der Differenz die gewünschte Größe. Bei der Verwendung von Gleichstrom und Glukose als Markierung benötigte man 2 unter identischen Bedingungen laufende Streifen. Diese wurden dann zu den entsprechenden Zeitpunkten herausgenommen, mit Anilinphthalat entwickelt und ausgemessen. Durch Vergleich mit den bei Wechselspannung erhaltenen Ergebnissen ließ sich der Einfluß der Elektroosmose abschätzen. Sie bewirkte im vorliegenden Fall eine Verschiebung der Streifen von etwa 1 cm/Std. zur Kathode.

¹⁸ *H. G. Kunkel* und *R. J. Slater*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **80**, 42 (1952).

¹⁹ *H. Michl*, Naturwiss. **41**, 403 (1954); Mh. Chem. **85**, 1240 (1954).

*Erzeugung der Gleichstromimpulse*⁸: Rechteckimpulse von 200 bis 400 Hz, Tastverhältnissen von 1:8 bei Amplituden bis 200 V/cm erzeugte man mittels rotierender Zerkleinerer. Höhere Frequenzen (20 000 bis 100 000 Hz) bei Tastverhältnissen von 1:1 bis 1:20 und Spannungsspitzen bis 250 V/cm erreichte man durch eine Kipperschaltung, wobei der Streifen als Begrenzer des Thyratrons diente (Abb. 8).

Die Versuchsanordnungen von 2 bis 3c gehen aus den Abbildungen hervor. Das Spannungsgefälle überschritt nicht 20 V/cm bei einer Streifenlänge von 20 cm.

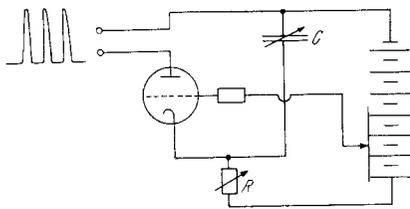


Abb. 8.

*Elektrophorese in Stärkeplatten*¹⁹:

1 Teil Kartoffelstärke (für 100 cm² etwa 20 g) wurde mit 2 Teilen Puffer aufgeschlemmt, 30 Min. stehen gelassen und dekantiert. Nach fünfmaligem Dekantieren goß man die zähflüssige Masse (Benetzungsgrad 70 bis 80%) auf eine nivellierte, dünne Glasplatte. Diese trocknete man dann bei 50°, bis kein Puffer mehr übersteht (Benetzungsgrad

55 bis 65%), was etwa 10 Min. beanspruchte. Die so präparierte Platte legte man auf die Kühlfläche der Elektrophoreseapparatur (wassergekühlter Metallblock⁹ mit einer dünnen Glasplatte zur Isolierung o. ä. — Kühleinrichtungen aus Kunststoff sind *nicht* geeignet) und brachte die Substanz mit einer Kapillare in Form eines Striches normal zur Längsrichtung auf. Der Stromanschluß zu den Puffergefäßen erfolgte durch mehrfach zusammengelegte, mit Puffer getränkte Filtrierpapierstreifen. Die Puffergefäße waren ihrerseits durch Stromschlüssel mit den reversibel arbeitenden Elektroden verbunden. Die angelegte Spannung lag bei 20 bis 50 V/cm. Nach Beendigung des Versuches lokalisierte man die Substanzen durch Abklatschen und hob an den so ermittelten Stellen die Stärke mit einer Spatel ab. Zur Eluierung brachte man sie in die Rinnen der in Abb. 7 gezeigten Anordnung. Es wurde hierbei Wasser, Puffer o. ä. durch einen Streifen aus weichem Filtrierpapier (WB 28) auf die Stärke gebracht und dieses durch eine Zunge aus dem gleichen Papier in die Kapillare gesaugt.

Dieser Arbeit kam eine Zuwendung der Austria Tabakwerke A. G. sowie der Österreichischen Akademie der Wissenschaften zugute, wofür an dieser Stelle gedankt sei.