

Präparative Zonenelektrophorese im Stärkemedium*

Von

B. Paletta

Medizinisch-chemisches Institut und *Pregl*-Laboratorium der Universität
Graz

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1961)

Die bereits früher beschriebene Anordnung¹ wurde zu einem Gerät weiterentwickelt, welches gestattet, auch größere Substanzmengen (bis 2 ml) in einem einzigen Arbeitsgang präparativ aufzutrennen.

Zur Gewinnung labiler Makromoleküle aus biologischem Material wird in steigendem Maße die elektrophoretische Differenzierung in verschiedenen Trägermaterialien herangezogen¹⁻⁸. Für die Anwendung von Stärkegel als Stabilisierungsmedium sprechen folgende Faktoren:

* Herrn Univ. Prof. Dr. O. Kratky zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ B. Paletta, Clin. chim. Acta [Amsterdam] **5**, 490 (1960).

² R. Conden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, Biochem. J. **40**, 33 (1946); Th. Wieland und F. Fischer, Naturwiss. **35**, 29 (1948); H. D. Cremer und A. Tiselius, Biochem. Z. **320**, 295 (1950); F. Turba und H. J. Enenkel, Naturwiss. **37**, 93 (1950).

³ M. D. Poulík und O. Smithies, Biochem. J. **68**, 636 (1958).

⁴ F. Turba und H. Enenkel, Naturwiss. **37**, 93 (1950).

⁵ F. Dietrich, Z. physiol. Chem. **302**, 227 (1950).

⁶ A. H. Gordon und P. Reichard, Biochem. J. **48**, 56 (1951).

⁷ P. Grabar und C. A. Williams, Biochim. biophys. Acta **10**, 193 (1953).

⁸ O. Smithies, Biochem. J. **61**, 629 (1955); J. Uriel und J. J. Scheidegger, Bull. Soc. Chim. biol. **37**, 165 (1955); K. V. Giri, Naturwiss. **43**, 36 (1956); W. Bockemüller und A. Oerter, Arb. Paul-Ehrlich-Inst., Georg-Speyer-Haus, Frankfurt a. M., Ferd.-Blum-Inst., Heft 52 (1956), 61; Th. Wieland, G. Pfeleiderer und H. L. Rettig, Angew. Chem. **70**, 341 (1958); G. Berg, L. R. Trabulsi und F. Scheiffarm, Klin. Wschr. **36**, 202 (1958); J. Porath, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **22**, 151 (1956); W. Reuter, Biochem. Z. **331**, 337 (1959); E. Wintersberger und H. Tuppy, Mh. Chem. **91**, 406 (1960); V. Lange, Biochem. Z. **333**, 503 (1961).

1. In Stärkegel tritt keine irreversible Adsorption auf, es kommt nicht zu der in anderen Materialien oft zu beobachtenden Schleppbildung, sondern zu präzisen Zonenbanden.

2. Stärkegele sind verhältnismäßig hochprozentig und weisen eine Porengröße auf, welche in der Größenordnung der biologisch wichtigsten Makromoleküle liegt, so daß infolge Siebwirkung ein zusätzlicher Trenneffekt zustande kommt.

3. Die Konsistenz der Stärkegele gestattet, nach erfolgter Trennoperation dünne Längsschnitte anzulegen, welche zu analytischen Zwecken angefärbt werden, während aus den zugeordneten Hauptsegmenten des Gels die einzelnen Fraktionen größtenteils wieder nativ zurückgewonnen werden können.

Damit diese Zuordnung zwischen Kontrollstreifen und Gelrest auch bei ähnlich laufenden Komponenten durchgeführt werden kann, dürfen während des Trennvorganges keine Verzerrungen der wandernden Fronten auftreten. Voraussetzung dazu ist die Schaffung homogener Temperatur- und Spannungsverhältnisse im Trägerquerschnitt. Über eine Anordnung, welche diese Forderungen berücksichtigt, wurde bereits an anderer Stelle berichtet¹, doch liegt es im Prinzip dieses Verfahrens, Materialmengen lediglich bis 0,2 ml zu untersuchen. Andererseits besteht sehr oft das Problem, größere Substanzmengen möglichst in einem Arbeitsgang aufzutrennen, um für die weitere Analyse der isolierten Gruppen genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben. Die Aufschließung der Methode für solche Kombinationsverfahren veranlaßte nun ihre Übertragung in den präparativen Maßstab.

1. Beschreibung der Apparatur

Abb. 1 zeigt das Prinzip der Trennkammer in ihrem Querschnitt. Das Gel wird über den unteren Kühlraum aufgegossen und weist nach dem Erstarren eine brückenartige Form auf. Die Grundflächen der beiden „Pfeiler“ und damit die Stirnseiten der Trägerschicht stehen über ein Diaphragma in direktem Kontakt mit dem Gel. Zwischen Diaphragma und Gel befindet sich eine Cellophanhaut, welche den Durchgang von Flüssigkeit, nicht aber von Ionen hemmt und so vor unkontrollierbaren Flüssigkeitsverschiebungen im Gel schützt⁹. Zur Gewährleistung einer nach beiden Schichtseiten möglichst gleichmäßigen Wärmeabführung ist auch die obere Gelfläche mit einem Kühlmantel abgedeckt. Da der langgezogene Trägerquerschnitt immerhin etwa dreimal so hoch als in der bisherigen Konstruktion ist, mußte für beide Kühlflächen Glas als geeigneter Wärmeleiter herangezogen werden. Die Glasflächen wurden überall dort, wo sie mit Plexiglas zusammentreffen, vorsichtig angeschliffen und mittels

⁹ R. Weber, *Helv. chim. Acta* **34**, 2031 (1951).

eines Zweikomponentenklebers mit dem Plexiglas abgedichtet. Innerhalb der Glasschlangen des unteren Kühlraumes wird Pufferlösung durch das

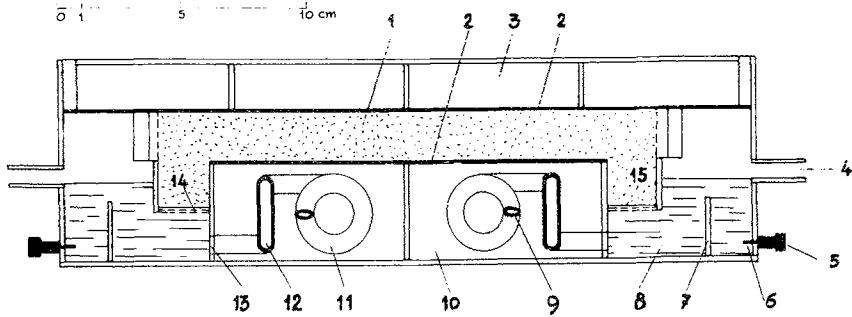


Abb. 1. Vertikaler Längsschnitt durch die Trennkammer

umgebende Leitungswasser vorgekühlt und strömt dann in Richtung der Elektroden, so daß auf diese Weise unerwünschte Elektrolysenprodukte vom Meßraum abgehalten werden.

Der Puffer wird zur kontinuierlichen Erneuerung aus einem Vorratsgefäß (Abb. 2) mittels eines Aggregates durch ein Reinigungsfilter über das Kühlschlängensystem in die beiden Elektrodenräume gepumpt, von wo er wieder zum Vorratsgefäß zurückgeleitet wird. Die Geschwindigkeitsregelung erfolgt durch die beiden Hähne der Tropfenzähler. Abb. 3 zeigt schematisch die Trennkammer, diesmal von oben aus gesehen. Durch verstellbare Glasroste können Gelfelder in variablen Breiten abgegrenzt werden. Eine solche Anordnung vermeidet nicht nur die gefürchteten Ribbildungen bei der Herstellung und Weiterverarbeitung größerer Gelblöcke sowie Schwierigkeiten in der Beschickung der Startzone

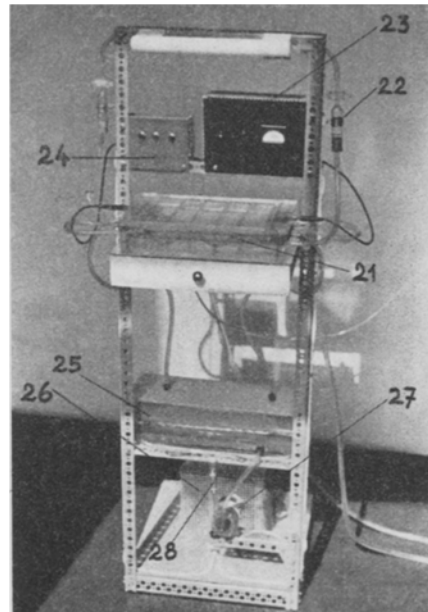


Abb. 2. Foto der Gesamtanordnung

mit Probeflüssigkeit, sie kann vielmehr auch den verschiedenen Problemstellungen, angefangen von der Auftrennung geringer Substanzmengen bis zur Lösung höherer präparativer Aufgaben, voll angepaßt werden.

2. Technische Angaben

Sämtliche Baustoffe des Gerätes, welche mit der Pufferlösung in Berührung kommen, sind entweder aus Glas oder Kunststoffen gefertigt, welche beständig gegen Säuren, Laugen und Öle, nicht aber gegen organische Lösungsmittel sind. Maße und andere Einzelheiten sind aus den Abbildungen zu ersehen. Das wartungsfreie Kleinpumpenaggregat der Type 381/220 von der

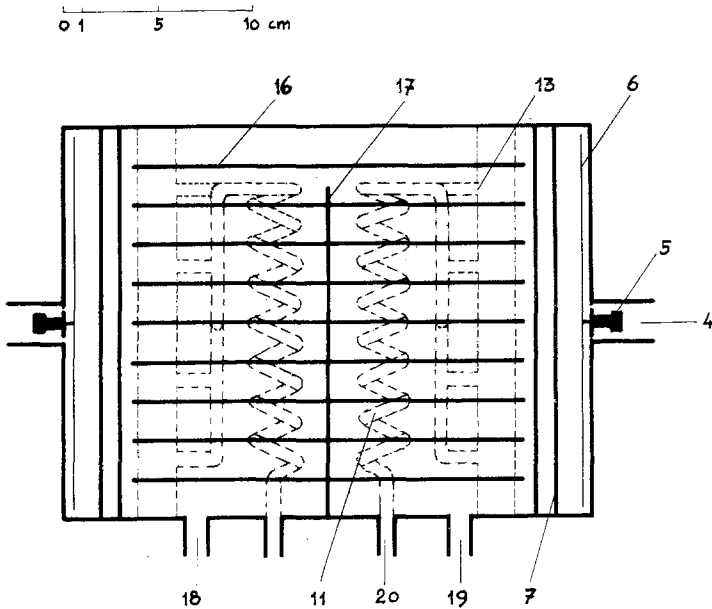


Abb. 3. Die Trennkammer von oben aus gesehen

Fa. Eheim/EBlingen zeichnet sich durch seinen indirekten, magnetischen Antrieb aus, ein Überlasten wird dadurch ausgeschlossen. Die Einführung der Probeflüssigkeit in die Trägermasse sowie Herstellung, Schnitt, Markierung und Anfärbung der Gele erfolgen in gleicher Weise, wie sie bereits beschrieben wurden^{1, 2}. Bei einer Klemmenspannung von 600 V beträgt bei Verwendung eines 0,035 m Boratpuffers von pH = 8 die Trenndauer einer Serumlösung ca. 10 Stunden. In einem Arbeitsgang können mit einer Apparatur mit den angegebenen Maßen bis 2 ml Probeflüssigkeit aufgetrennt werden.

3. Erläuterungen zu den Abbildungen

1 Trägermasse, 2 Kühlflächen aus Glas, 3 oberer Kühlraum, 4 Pufferabfluß, 5 Stromanschluß, 6 Platin-Elektroden, 7 Hinderniswand, 8 Elektrodenraum mit Pufferlösung, 9 Schnitt durch die Glaskühlschlangen, 10 unterer Kühlraum, 11 Glaskühlschlangen, 12 Schnitt durch die Pufferleitung (ebenfalls aus Glas), 13 Pufferzuführung zum Elektrodenraum, 14 Diaphragma, 15 Cellophanmembran, 16 Roste zum Abgrenzen der Gelmasse, 17 Unterteilung des unteren Kühlraumes, 18 Zufuß der Kühlflüssigkeit, 19 Abfluß der Kühlflüssigkeit, 20 Pufferzuführung von den Geschwindigkeitsreglern, 21 Trennkammer 22 Geschwindigkeitsregler für den Pufferstrom, 23 Anzeigetafel, 24 Schalttafel, 25 Puffer-Vorratsgefäß, 26 Netzgerät und Stabilisierung, 27 Pumpenaggregat 28 Reinigungsfilter