

Protein	Elutionsbereich
R-Phycoerythrin .....	0,005–0,008 m Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
R-Phycocyanin .....	0,030–0,040 m Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Ei-Albumin: Komponente I	0,005–0,007 m Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Ei-Albumin: Komponente II	0,010–0,012 m Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Menschliches Serum-Albumin	0,050–0,070 m Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Rinder-CO-Hämoglobin ....	0,040–0,050 m Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Schnecken-Hämocyanin ...	0,040–0,050 m Phosphat-Puffer p <sub>H</sub> = 6,7 + 0,2 m NaCl
Schnecken-Hämocyanin ...	0,008–0,010 m Phosphat-Puffer p <sub>H</sub> = 6,7
Tabak-Mosaik-Virus .....	0,100–0,120 m Phosphat-Puffer p <sub>H</sub> = 6,7

Tabelle 2

Sicher gibt es viele andere passende Adsorbentien, die sich zur Chromatographie von Eiweiß und ähnlichen Substanzen eignen. So haben z. B. *Sober* und *Petersen*<sup>31)</sup> die Verwendung von Ionenaustauschern aus modifizierter Cellulose für solche Zwecke beschrieben und damit u. a. Serum und Enzyme chromatographiert.

Auf unseren Säulen läßt sich auch Tabakmosaik-Virus reinigen. Allerdings werden die Zonen durch Viscositätsstörungen stark verzerrt.

### Ausblick

Manche Eiweißkörper und auch Virusarten zeigen bei höheren Salzkonzentrationen, z. B. von Ammoniumsulfat, eine sehr viel stärkere Adsorption als aus salzfreiem Medium. Diese sog. „Aussalzungsadsorption“ (*Tiselius* 1948<sup>32)</sup>) ist von verschiedenen Autoren ausgenutzt worden, um be-

sonders hochmolekulare Proteine, Viren und teilchenartige Formelemente aus Zellen zu isolieren (z. B. *Riley*<sup>33, 34)</sup>). Diese Beispiele seien genannt, um zu zeigen, daß die „obere Grenze“ der Teilchengröße noch nicht erreicht ist. Es liegt hier ein außerordentlich wichtiges Gebiet vor uns. Es handelt sich ja nicht nur um die Entwicklung von spezifischen Methoden zur Isolierung von Viren und ähnlichen sehr großen Molekeln, die ja noch manchmal als chemische Individuen anzusehen sind. Die Isolierung von partikelartigen Elementen aus biologischem Material hat während der letzten Jahre immer größere Bedeutung gewonnen. Studien über Mitochondrien, Mikrosomen und verschiedene Arten von Granula scheinen ganz neue Wege zum Verständnis biochemischer Reaktionen in der lebenden Zelle zu eröffnen. Die systematische Isolierung und Analyse von Zellfragmenten kann uns sehr wichtige Auskünfte über strukturelle Gesetzmäßigkeiten liefern. Selbstverständlich müssen dabei viele verschiedene Methoden benutzt werden; bisher haben wohl Zentrifugiermethoden die größte Rolle gespielt. Es scheint mir aber, daß sowohl Elektrophorese wie Chromatographie, die ja auf anderen Gebieten der Chemie eine so ausgeprägte Spezifität gezeigt haben, auch hier vieles leisten könnten, wenn die Verfahren den besonderen Problemen angepaßt werden. Man braucht nur an die Verwendung von Flotationsverfahren in der Technik zu denken, um einzusehen, daß neue, wichtige biochemische Anwendungen der Adsorption und ähnlicher Erscheinungen, auf denen die Chromatographie beruht, zu erwarten sind.

Eingeg. am 31. Januar 1955 [A 641]

<sup>31)</sup> H. A. Sober u. E. A. Peterson, J. Amer. chem. Soc. 76, 1711 [1954].  
<sup>32)</sup> A. Tiselius, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 26 B, No. 1 [1948].

<sup>33)</sup> V. T. Riley, Science [Washington] 107, 573 [1948].  
<sup>34)</sup> V. T. Riley, Science [Washington] 109, 361 [1949].

## Stofftrennungen durch Hochspannungs-Papierelektrophorese

Von Dr. G. WERNER und Prof. Dr. O. WESTPHAL

Dr. A. Wander-Forschungsinstitut, Säckingen/Baden

Es wird ein Verfahren beschrieben, mit welchem Papierelektrophoresen bei Spannungen bis zu 10000 Volt und Wanderungswegen bis zu 1 m möglich sind. Eine besondere Art des Aufbringens der Substanzlösung auf den Papierstreifen wird beschrieben, sowie über eine Einrichtung berichtet, mit welcher es möglich ist, besonders lange Papierstreifen gleichmäßig und reproduzierbar anzufeuchten. Die Leistungsfähigkeit der Apparatur wird an Trennungen von Aminosäuren, Peptiden, Zuckern und anorganischen Ionen demonstriert.

Eine besondere Domäne der papierelektrophoretischen Analyse bei niederen Spannungen ist die weit verbreitete und eingehend ausgearbeitete Trennung der Serumproteine<sup>1)</sup>. Bei der Trennung von Substanzen mit kleinem bis mittlerem Molekulargewicht durch Niedervolt-Elektrophorese werden die Banden aber während längerer Laufzeiten durch Diffusion und andere Effekte so stark verbreitert, daß die erwünschte Trennschärfe nicht erzielt werden kann. Bei höheren Spannungen ist dagegen die Wanderungsgeschwindigkeit erheblich größer, die Laufzeit und damit auch die Diffusionseffekte sind vergleichsweise wesentlich kleiner. Andererseits muß die mit steigender Spannung quadratisch anwachsende Stromwärme abgeleitet werden, um ein Austrocknen des mit Elektrolyt angefeuchteten Papierstreifens zu verhindern.

*Michl*<sup>2)</sup> hat eine Anordnung zur Hochspannungs-Elektrophorese beschrieben, bei welcher der elektrolyt-getränkte Papierstreifen, in Anlehnung an ein von *Cremer* und *Tiselius*<sup>3)</sup> beschriebenes Verfahren, in Toluol eingehängt wird, welches die Stromwärme aufnimmt und gleichzeitig als Isolator wirkt. Das gleiche Verfahren benutzten *Kickhöfen* und *Westphal*<sup>4)</sup>, sowie *Turba*<sup>5)</sup> und *Lange*<sup>6)</sup>. *Markham* und *Smith*<sup>7)</sup> verwendeten zum gleichen Zweck Tetrachlorkohlenstoff, *Heilmeyer* und Mitarbeiter<sup>8)</sup> Hexan, und *Kickhöfen*<sup>9)</sup> neuerdings das billigere Heptan. — Ein anderes Prinzip der Wärmeableitung vom Elektrophorese-

<sup>1)</sup> W. Grassmann u. K. Hannig, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 290, 1 [1951]; Klin. Wschr. 32, 838 [1954]; siehe z. B. auch J. Pieper u. H. Molinski, Klin. Wschr. 32, 985 [1954]; Ch. Wunderly: Die Papierelektrophorese, Verlag H. R. Sauerländer & Co. Aarau u. Frankfurt/Main, 1954.

<sup>2)</sup> H. Michl, Mh. Chem. 82, 489 [1951].

<sup>3)</sup> H. D. Cremer u. A. Tiselius, Biochem. Z. 320, 373 [1950].

<sup>4)</sup> B. Kickhöfen u. O. Westphal, Z. Naturforsch. 7 b, 655 [1952].

<sup>5)</sup> F. Turba, H. Pelzer u. H. Schuster, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 296, 97 [1954].

<sup>6)</sup> G. Lange, Biochem. Z. 326, 172 [1955].

<sup>7)</sup> R. Markham u. J. D. Smith, Nature [London] 168, 406 [1951].

<sup>8)</sup> L. Heilmeyer, R. Clotten, J. Sano, A. Sturm u. A. Lipp, Klin. Wschr. 32, 831 [1954].

<sup>9)</sup> B. Kickhöfen, persönl. Mitteilung.

streifen haben *Kraus* und *Smith*<sup>10)</sup>, sowie *Michl*<sup>11)</sup>, *Foster*<sup>12)</sup> und *Gross*<sup>13)</sup> empfohlen. Der zwischen dünnen Glas- oder Kunststoffplatten liegende Papierstreifen wird durch beidseitig aufliegende Metallgefäße, die mit Leitungswasser durchströmt werden, gekühlt. Über weitere Möglichkeiten zur Abführung der Widerstandswärme und Verhinderung der Pufferverdampfung berichteten zusammenfassend *McDonald* und Mitarbeiter<sup>14)</sup> sowie *Valmet* und *Svensson*<sup>15)</sup>.

In einigen Fällen haben sich diese Verfahren sehr gut bewährt. Sie weisen indessen hinsichtlich Betriebssicherheit und Anwendungsbreite einige Nachteile auf. Die genannten Kühlmittel sind zum großen Teil brennbar und fordern deshalb besondere Vorsichtsmaßnahmen. Bei der Wahl des Elektrolyten ist dessen Unlöslichkeit im Kühlmittel eine Vorbedingung. Nach mehrfachem Gebrauch muß das Kühlmittel aber doch gereinigt werden, da sich letztlich geringe Mengen des Elektrolyten darin lösen und die Leitfähigkeit nach und nach etwas erhöhen. Während der Elektrophorese-Versuche kann es am Streifen zu Funkenbildung kommen, deren Ursache u. a. die teilweise Verdrängung von Elektrolytflüssigkeit aus dem Papierstreifen durch das Kühlmittel ist. Im Kühlmittel lösliche Stoffe werden aus dem Papierstreifen extrahiert und damit dem späteren Nachweis entzogen. Bei Naturstoffgemischen unbekannter Zusammensetzung können so Komponenten der Analyse entgehen. Bei den Metallplattenkühlern ist die Durchschlagsfestigkeit bei der herrschenden Feuchtigkeit nur bei relativ niederen Spannungen absolut gesichert.

Wir haben uns in den letzten Jahren bemüht, eine Anordnung auszuarbeiten, welche die geschilderten Nachteile umgeht. Nach verschiedenen Vorversuchen gelangten wir zu folgendem Prinzip: Der Elektrophorese-Streifen liegt in einer allseits geschlossenen „feuchten Kammer“ auf einer Kunststoffplatte. Diese kann von unten her durch strömende Solelösung ständig auf konstant tiefen Temperaturen gehalten werden, so, daß der aufliegende Papierstreifen bei Stromfluß eine Temperatur um 0 °C annimmt. Die Anordnung gestattet es, bei Gleichspannungen bis zu etwa 10000 Volt und während praktisch unbegrenzter Versuchsdauer ohne besondere Sicherungsmaßnahmen und ständige Aufsicht zu arbeiten, wobei weder ein Ansteigen des von vornherein festgelegten Feuchtigkeitsgrades, noch ein Austrocknen des Papierstreifens stattfindet. Bei Elektrophoresen in dieser Apparatur ändert sich — im Gegensatz zu Anordnungen mit direktem Kontakt zwischen Elektrophoresestreifen und Kühlflüssigkeit — die elektrische Stromstärke während vieler Stunden praktisch nicht; Versuche sind daher gut reproduzierbar.

### Die Apparatur

Notwendig sind außer dem eigentlichen Elektrophorese-Apparat ein Solekühler mit Umlaufpumpe und ein Gleichrichter<sup>16)</sup> zur Erzeugung des hochgespannten Gleichstroms (Übersicht siehe Bild 1).

Der Elektrophorese-Apparat besteht aus einer Kühlkammer, in die der Papierstreifen eingelegt wird, und den Elektroden-Gefäßen. Das Gerät wurde in eigener Werkstatt in drei verschiedenen Größen für Wanderungswege von 30, 60 (Bild 2) und 100 cm hergestellt. Als Baumaterial verwendeten wir den rot gefärbten Kunststoff „Vinidur“ oder das nahezu farblose und durchsichtige „Trovidur“<sup>17)</sup>. Beide sind sehr resistent gegen chemi-

<sup>10)</sup> K. A. Kraus u. G. W. Smith, J. Amer. chem. Soc. 72, 4329 [1950].

<sup>11)</sup> H. Michl, Mh. Chem. 83, 737 [1952].

<sup>12)</sup> A. B. Foster, Chem. and Ind. 1952, 1050; J. Chem. Soc. [London] 1953, 982.

<sup>13)</sup> D. Gross, Nature [London] 172, 908 [1953]; 173, 487 [1954].

<sup>14)</sup> H. J. McDonald u. Mitarb., Clin. Chemist 5, 17, 35, 51 [1953].

<sup>15)</sup> E. Valmet u. H. Svensson, Science Tools 1, 3 [1954].

<sup>16)</sup> Wir benutzten zwei Quecksilberdampf-Dioden (866 A); Glättung durch 4 Kondensatoren zu je 2 µF.

<sup>17)</sup> Trotz besserer Wärmeleitfähigkeit wurde auf die Verwendung von Glas wegen seiner schlechteren Verarbeitungsmöglichkeiten, seiner Bruch-Empfindlichkeit gegenüber Schlag und Temperaturunterschieden verzichtet.

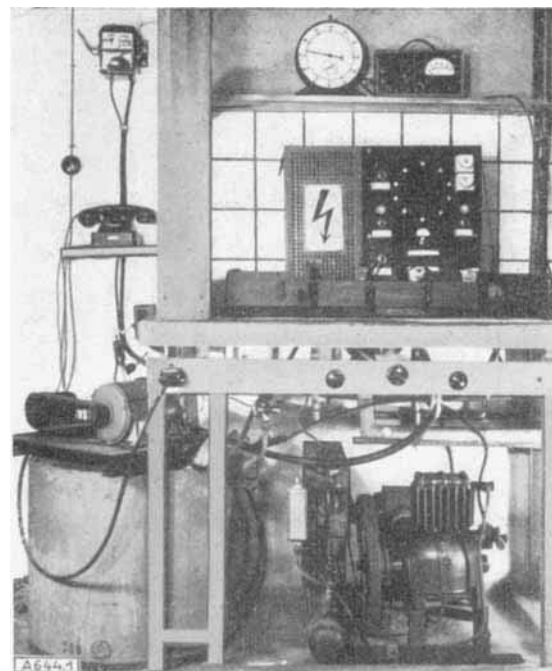


Bild 1

Elektrophorese-Apparatur mit Gleichrichter und Voltmeter, Kühl-aggregat, Solebehälter und Umlazpumpe

sche Angriffe und nicht brennbar<sup>18)</sup>. Die elektrische Durchschlagsfestigkeit (VDE 0303) beträgt 40–50 KV/mm<sup>18)</sup>. 3 und 5 mm dicke Platten werden durch Kunststoff-Schweißung verbunden, wobei die Schweißnähte sorgfältig ausgeführt werden müssen, da erfahrungsgemäß auch

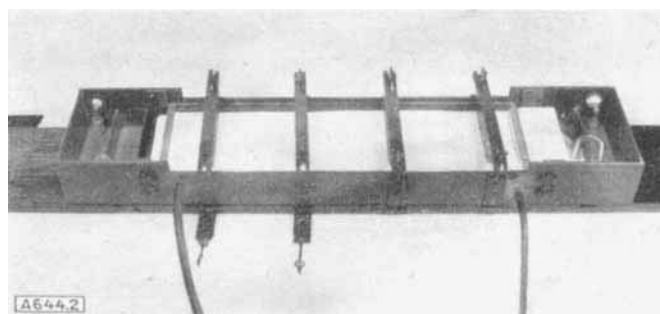


Bild 2

Elektrophorese-Apparatur für Wanderungswege von 60 cm (linke Zuleitungszunge und Heber sind entfernt)

winzige Poren bei den hohen Spannungen und der herrschenden Feuchtigkeit zu örtlichen Kurzschlüssen und zunehmenden Undichtigkeiten führen. Die Bilder 3 und 4 zeigen die Apparatur schematisch.

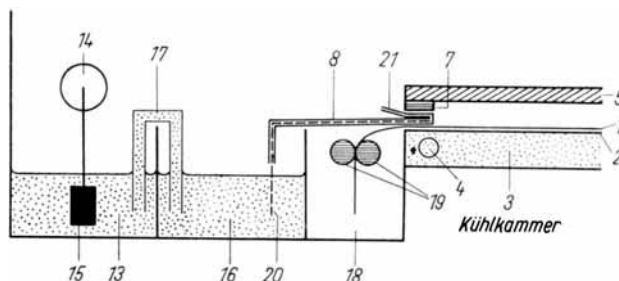


Bild 3

Elektrophorese-Apparatur (Längsschnitt)

<sup>18)</sup> Beständigkeitsliste und Eigenschaftswerte der Kunststoff G.m. h. H. Troisdorf.

Die Kühlkammer. Der 15 cm breite Filtrierpapierstreifen (1) liegt auf einer 17,5 cm breiten Kunststoffplatte von 3 mm Dicke, die durch darunter strömende Kühlflüssigkeit auf einer bestimmten Temperatur gehalten werden kann. Mit Hilfe einer Umwälzpumpe (Leistung ca. 10 l/min) wird die Kühlkammer (3) mit der Kühlflüssigkeit — einem Glycerin/Wasser-Gemisch — durchströmt. Zwischen Pumpe und Kammer ist in der Zuleitung ein

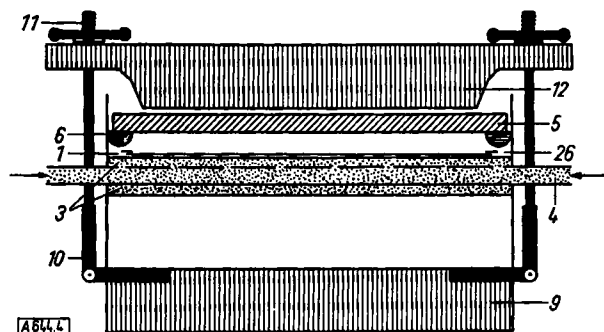


Bild 4  
Elektrophorese-Kammer (Querschnitt)

Drosselventil eingeschaltet, welches die Durchströmungsgeschwindigkeit reguliert. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit wird durch einen Regler konstant gehalten. Die Solelösung wird zu- und abgeleitet durch beiderseits offene, 25 cm lange Vinidurrohre, in welche längs einer waagerechten Geraden Löcher in 2 cm Abstand eingelassen sind. Diese Löcher im Zuleitungsrohr (4) der Solekammer haben eine geringere Lichtweite (2 mm  $\varnothing$ ) als die des Ausflußrohres am anderen Ende der Kammer (3 mm  $\varnothing$ ), damit beim Durchpumpen der Kühlflüssigkeit die Kühlfläche sich infolge von Flüssigkeitsstauungen nicht übermäßig aufwölben kann. Der Solefluß darf deshalb nicht versehentlich falsch gepolt werden. Um bevorzugt gekühlte Strömungsstraßen in der Kühlkammer zu vermeiden, erwies es sich als zweckmäßig, die Zu- und Ableitung der Sole durch beide Seiten der Rohre vorzunehmen, wodurch eine gleichmäßige Strömungsfront entsteht.

Vor Beginn jeder Elektrophorese muß man sich davon überzeugen, daß keine Luftblasen in der sole-gefüllten Kammer vorhanden sind<sup>19</sup>. Sonst kann an solchen Stellen ungenügender Kühlung Elektrolytflüssigkeit verdampfen, und infolge der Austrocknung entstehen in einzelnen Bezirken des Papierstreifens Potentialunterschiede, die ein Überspringen von Funken verursachen. An solchen Stellen kann der Papierstreifen und die Oberfläche der Kühlplatte verkohlen. Entsteht einmal eine derartige örtliche Erwärmung des Streifens, so bildet sich alsbald an der darüberliegenden Glasplatte (5; s. unten) Kondenswasser, worauf man den Versuch abbrechen und zunächst die Luftblasen aus der Kühlsole entfernen muß.

Die Kühlfläche wird nach Auflegen des Papierstreifens mit einer gleichgroßen Glasplatte (5) von 8–10 mm Dicke bedeckt. Diese ist an den Längsseiten mit einem Schaumgummistreifen (6) von halbkreisförmigem Querschnitt (Radius ca. 0,6 mm) beklebt. Die beiden Schmalseiten sind mit einem 1 cm breiten und ca. 0,5 cm dicken Schaumgummiband (7) versehen, das mit einem Celluloidband überklebt ist. Durch eine Pressvorrichtung wird die Glasplatte mit ihren Schaumgummibändern auf die Kühlfläche aufgedrückt, wodurch zwischen der eigentlichen Kühlfläche mit dem aufliegenden elektrolyt-getränkten Papierstreifen und der in wenigen Millimeter Abstand darüber befindlichen Glasplatte eine gut isolierte, geschlossene „feuchte Kammer“ entsteht. Auf diese Weise ist für guten Kontakt des Papierstreifens mit den Zuleitungen (8) und die Abdichtung an den Längsseiten des Streifens gesorgt. Die Pressvorrichtung besteht aus einer dicken Kunststoffplatte (9), an deren Längsseiten in Abständen von 15 cm Scharniere (10) mit Schrauben und Flügelmutter (11) angebracht sind, welche Bügel (12) aus Holz oder Vinidur auf die Glasplatte drücken.

Die Elektroden-Gefäße zu beiden Seiten der Kühlkammer sind durch eine Querwand in je zwei puffergefüllte Fächer aufgeteilt. In das äußere erste Fach (13) mündet die Stromzuführung (14); eine Platinelektrode (15) ist in einer Anordnung aus Glas derart eingeschmolzen, daß die entstehenden gasförmigen Elektrolysenprodukte aus der Pufferflüssigkeit rasch entweichen können. Als weitere Sicherung gegen Verunreinigungen des Streifens durch Elektrolysenprodukte dient das zweite Fach (16), in welches die Zuleitungszunge (8) eintaucht. Die Fächer sind durch einen Glasheber (17) verbunden.

<sup>19</sup> Bei Vinidur durchleuchten wir die schräg gestellte Kammer mit einer Lampe.

Ein drittes Fach (18) nimmt die Spannvorrichtung (19) für den Papierstreifen (1) auf. Zwischen zwei durch Federn zusammengepreßten drehbaren Gummiwalzen wird der Papierstreifen festgehalten, durch Drehen der Walzen vorsichtig gespannt und dann arretiert. Die Spannvorrichtung verbürgt die gleichmäßige Auflage des Papierstreifens auf der Kühlfläche.

Die Zuleitungszungen. Da der Elektrophoresestreifen mit Elektrolyt nicht tropfentrocken angewendet wird (Feuchtigkeitsgehalt ca. 110 % des trockenen Streifens) würde an den in Pufferflüssigkeit eintauchenden Enden des Papierstreifens der sogenannte „Dochteffekt“<sup>20</sup> wirksam werden. Auf Vorschlag von Weber<sup>21</sup> und Michl<sup>22</sup>) kann man diesen nahezu verhindern, indem man eine Cellophanmembran zwischen Elektrolytflüssigkeit und Papierstreifen einschaltet. Durch die Anordnung kann überdies der endosmotische Effekt nahezu ganz unterdrückt werden, ohne daß die elektrische Leitfähigkeit wesentlich vermindert wird. Ein ungefähr 10 cm langer Streifen aus Filtrierpapier oder Leinwand (20) von der Breite des Elektrophoresestreifens wird etwa zur Hälfte in einen 10 cm langen und 17 cm breiten Dialysierschlauch (21) geschoben, einige Zeit in Elektrolytlösung gelegt, und diese dann in der Walzenpresse oder auf Filtrierpapier abgepreßt. Nun wird der feuchte Dialysierschlauch am Ende des darin befindlichen Papier- bzw. Leinwandstreifens gefaltet und die elektrische Verbindung zwischen dem Elektrolyten des zweiten Faches (16) und dem Elektrophoresestreifen (1) in der aus Bild 3 ersichtlichen Weise hergestellt.

Um ein homogenes elektrisches Feld zu erreichen, muß auf guten Kontakt des Papierstreifens (1) mit den Stromzuleitungszungen (8) gesehen werden, was durch Anpressen mittels des an der Glasplatte (5) angeklebten Schaumgummistreifens (7) gelingt.

Um den bis zu mehr als 1 m langen Papierstreifen gleichmäßig und reproduzierbar mit Pufferflüssigkeit anzufeuchten wird eine Walzenpresse benutzt (Bild 5). Zwei gegenläufig drehbare Gummiwalzen (22) werden durch einen variabel einstell-

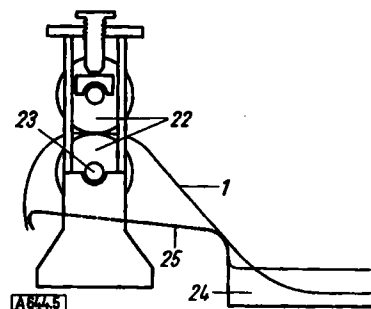


Bild 5  
Walzenpresse (Querschnitt)

baren und meßbaren Druck aufeinander gepreßt. Am zentralen Metallkern der unteren Walze (23) ist eine Kurbel angebracht. Der Papierstreifen liegt zur Durchfeuchtung in einem elektrolyt-gefüllten Trog aus Vinidur (24), dessen eine Seitenwand (25), um mehr als das Doppelte verlängert und nahezu rechtwinklig abgebogen, bis unter die beiden Walzen reicht. Aus dem Trog heraus wird der tropfnasse Papierstreifen (1) zwischen die Walzen geschoben, die ihn weitertransportieren und je nach Druck eine bestimmte Menge Flüssigkeit abpressen, die zurückfließt.

Die gleichmäßige Durchtränkung des Streifens mit Pufferflüssigkeit ist nicht zuletzt wesentlich im Hinblick auf die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Stoffe, welche über die ganze Streifenbreite die gleiche sein muß, um Identifizierungsversuche und präparative Aufarbeitungen zu gestatten.

### Arbeitsweise<sup>23)</sup>

Vor Beginn des Elektrophorese-Versuchs wird die Kühlfläche der Kammer gereinigt, trocken gerieben, zunächst mit einem Bogen Filtrierpapier überdeckt und die Glasplatte (5) darüber gelegt, wodurch Kondenswasser- oder Eisbildung auf der Kühlfläche vermieden werden soll.

<sup>20</sup> „Durch Kapillarkräfte bewirkte Strömungen des Elektrolyten im Filtrierpapierstreifen“ (R. Weber<sup>21</sup>).

<sup>21</sup> R. Weber, *Helv. Chim. Acta* 34, 2031 [1951].

<sup>22</sup> H. Michl, *Mh. Chem.* 83, 210 [1952].

<sup>23</sup> Über die detaillierte Arbeitsvorschrift hat G. Werner kürzlich berichtet: 1. Europ. Kongr. f. klin. Chemie, Sept. 1954 in Amsterdam; Rec. Trav. chim. Pays-Bas, Sonderheft [1955], im Druck.

Nachdem sich der 15 cm breite Streifen im Trog (24) maximal mit Elektrolyt vollgesogen hat, wird er vorsichtig durch die Walzenpresse gedreht. Wir stellten den Druck der beiden Walzen gegeneinander im allgemeinen so ein, daß der Papierstreifen jeweils 110% Elektrolyt enthielt. Der homogen puffergetränkte Streifen wird entweder direkt auf die Kühlfläche der Kammer oder, falls das Auftragen der Substanz(en) länger als einige Minuten in Anspruch nimmt, zunächst auf eine Glasplatte aufgelegt.

Auftragen der Substanzlösungen: Zweckmäßig wird ein 1 cm breites und ca. 15 cm langes Klötzchen aus fester Kohlensäure (gesägt aus der von der Eyacher-Kohlensäure-Industrie gelieferten Plattenware) unter die Glasplatte mit dem elektrolyt-getränkten Papierstreifen so gelegt, daß die Flüssigkeit an der beabsichtigten Auftragstelle gefriert. Nun kann man wäßrige Lösungen mit Hilfe einer Platinöse punktförmig oder mittels einer Kapillarpipette, deren Spitze etwas abgeflacht wurde, strichförmig auftragen. Bei den von uns verwendeten 15 cm breiten Streifen waren derartige Striche etwa 10–12 cm lang (siehe z.B. die Bilder 7–8). Die aufgetragene Lösung erstarrt sogleich und schmilzt erst, wenn der Streifen sich im elektrischen Feld der Elektrophorese-Kammer erwärmt. Man hat also einerseits Zeit für die weiteren Vorbereitungen und kann andererseits auf die gleiche Stelle mehrfach die gleiche Substanz oder verschiedene Substanzen auftragen, sodaß sich z. B. vorheriges Mischen erübrigt, was bei wertvollen Substanzproben vorteilhaft ist. Man erhält einen nur ca. 1 mm breiten Strich der Testlösung und kann auch quantitativ bestimmte Substanzmengen in dünner Zone auftragen.

Gelegentlich bewährte sich das Auflegen eines etwa 1 mm breiten, mit der Testlösung getränkten Papierstreifens, der dann auf dem Elektrophorese-Streifen aufringt und aus welchem nach dem Abschmelzen im elektrischen Feld die Stoffe auswandern. Dabei wird die Auftragstelle nicht feuchter als der übrige Papierstreifen und eine Verbreiterung der Zonen infolge hydromechanischer Effekte vermieden.

Der präparierte Papierstreifen wird nun auf die Kühlfläche der Kammer (2) sorgfältig aufgelegt, mit beiden Enden in die zunächst gespreizten Walzen der Spannvorrichtung (19) eingeschoben, eventuell noch mit einer Schaumgummiwalze glatt gestrichen, mäßig gespannt und mittels Flügelschrauben arretiert. Auf die Längsseiten des Elektrophoresestreifens werden 3–4 mm breite Randstreifen (26) aus Filterpapier, die ebenso befeuchtet sind wie der Versuchsstreifen, so aufgelegt, daß sie zur Hälfte direkt auf die Kühlfläche zu liegen kommen. Nach Auflegen der Zuleitungszungen (8) wird die Glasplatte (5) mit den angeklebten Gummidichtungen (6, 7) aufgesetzt und mit Hilfe der beschriebenen Preßvorrichtung (11) auf die Kühlfläche (2) angedrückt.

Die Randstreifen (26) erwiesen sich gegen folgenden Störeffekt als notwendig: Es ist praktisch kaum zu erreichen, daß die Längsseiten des Elektrophorese-Streifens genau mit der seitlichen Begrenzung der Kühlfläche abschließen. Daher kondensieren auf der nicht bedeckten Kühlfläche Wasser und eventuell flüchtiger Elektrolyt (Ameisensäure, Essigsäure, Pyridin usw.), die aus dem um einige Grade wärmeren Papierstreifen stammen. Diese Kondensflüssigkeit wird nun dauernd von den Randzonen des Papierstreifens kapillar eingesaugt, während sich auf der unbedeckten Kühlplatte ständig erneut Flüssigkeit aus dem Streifen niederschlägt. Dieser Kreisprozeß ändert die Zusammensetzung des Elektrolyten in den längsseitigen Randzonen des Streifens kontinuierlich. Es kommt zu verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten des gleichen Stoffes in den Randzonen gegenüber der Streifenmitte. Bei einem strichförmig über die Streifenbreite aufgetragenen Aminosäuren-Gemisch in Ameisensäure/Essigsäure z. B., bildeten die Komponenten nach mehrstündiger Wanderung infolge Absinkens des  $p_H$ -Wertes an den Streifenrändern und entspr. Änderung des Dissoziationsgrades, einen stumpfen Winkel mit der Spitze in Wanderungsrichtung.

Die Temperatur der Kühlsole wird jeweils so gehalten, daß der Papierstreifen bei Stromdurchgang kein Kondensat an die darüber gedeckte Glasplatte abgibt. Der Streifen soll stets trotz Stromdurchgang der kälteste Teil im System der „feuchten Kammer“ sein.

Neuerdings haben wir gefunden, daß es zweckmäßig ist, die den Streifen überdeckende Glasplatte, die sich während des Versuches stark abkühlt, auf einer Temperatur von 20–30° C zu halten. Dies kann man erreichen durch Anstrahlung mit elektrischen Glühlampen oder Heizleitern sowie durch elektrische Heizung der Glasplatte mittels aufliegender Nickelindrähte. Es wird dadurch möglich, daß eine um mehr als 50% höhere Spannung angewendet werden kann, ohne daß infolge der erhöhten Stromwärme eine Kondensation von Elektrolytflüssigkeit an der Glasplatte eintritt.

Andererseits darf natürlich der elektrolytfeuchte Streifen nach Auflegen auf die Kühlplatte nicht infolge zu starker Kühlung gefrieren. Den Erstarrungspunkt der Elektrolytlösung kann man durch Zusatz gefrierpunktniedrigender Stoffe herabsetzen, die möglichst leicht verdampfbar sein und die Leitfähigkeit nicht wesentlich erhöhen sollten (z. B. Methanol). Wir haben den Papierstreifen während des Versuches im allgemeinen auf einer Temperatur um 0° C gehalten.

Nach Einschalten der Hochspannung kann der Versuch durch Kontrolle der Spannung und Stromstärke überwacht werden. Die Wanderung gefärbter oder fluoreszierender Stoffe läßt sich durch die Glasplatte hindurch beobachten.

Soll der Versuch beendet werden, so wird zunächst die Stromzufuhr unterbrochen, die Preßvorrichtung gelockert und die Glasplatte abgehoben; dann werden die Zuleitungszungen und die Randstreifen entfernt, die Gummivalzen gelockert und die Enden des Papierstreifens herausgerollt und mit 2 Klammern gefaßt. Trocknung und Entwicklung des Pherogramms geschehen in bekannter Weise.

## Ergebnisse

Besonders geeignet erscheint die Hochspannungselektrophorese auf Papier zur Trennung und Identifizierung elektrisch geladener Substanzen von kleinem bis mittlerem Molekulargewicht. So bewährte sich die Methode bereits bei der Trennung von Aminosäuren und Peptiden<sup>24, 4, 24</sup>), bei Nucleotiden<sup>5</sup>) und anderen organischen Phosphorsäure-Derivaten, bei Borsäure-Komplexen der Zucker<sup>11–13, 25–27</sup>), bei Aminen<sup>21</sup>), Carbonsäuren<sup>3</sup>), Purinen<sup>28</sup>) usw. Die genannten Substanzen sind vielfach die Substrate biochemischer Systeme, so daß diese Art der Elektrophorese zahlreiche Anwendungen gerade auf biochemischem Gebiet verspricht (vgl. z. B.<sup>29</sup>)). Man darf erwarten, daß prinzipiell alle im elektrischen Feld wandernden Stoffe mit Hilfe der beschriebenen Apparatur untersucht werden können. Ob eine Anwendung bei hochmolekularen Stoffen, wie z. B. Proteinen, Polysacchariden und Nucleinsäuren (mit ihrer an sich sehr geringen Diffusionsgeschwindigkeit) möglich ist und einen praktischen Vorteil gegenüber der bewährten Niedervolt-Elektrophorese bieten würde, erscheint vorerst fraglich.

Im folgenden geben wir einige Beispiele für Trennungen, die mit Hilfe der beschriebenen Apparatur ausgeführt wurden. Alle Abbildungen zeigen Elektrophorese-Streifen von 15 cm Breite. Der Flüssigkeitsgehalt betrug jeweils 110% des trocknen Streifens (Papiersorte 2043a MGI, *Schleicher & Schüll*).

<sup>24</sup>) F. Turba u. E. Esser, diese Ztschr. 65, 256 [1953].

<sup>25</sup>) R. Condsen u. W. M. Stanier, Nature [London] 169, 783 [1952].

<sup>26</sup>) L. Jaenicke, Naturwiss. 39, 86 [1952].

<sup>27</sup>) Y. Hashimoto, I. Mori u. M. Kimura, Nature [London] 170, 975 [1952].

<sup>28</sup>) H. Michl u. F. Haberler, Mh. Chem. 85, 779 [1954].

<sup>29</sup>) G. Werner, in O. Westphal u. O. Lüderitz, diese Ztschr. 66, 407 [1954], S. 415.

Die Bilder 6 und 7a, b zeigen Trennungen von Aminosäuren und Peptiden. Als Elektrolyt diente 2n Essigsäure/0,6n Ameisensäure ( $p_H \sim 2$ ). Von den einzelnen

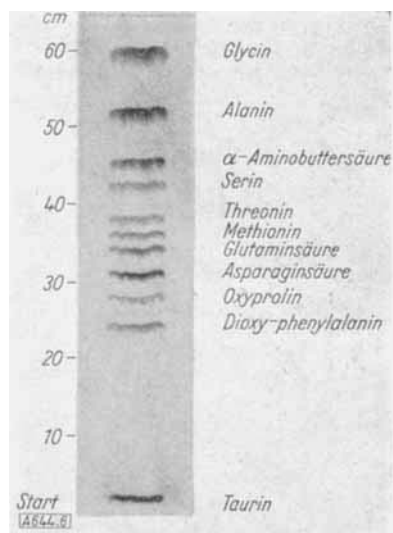


Bild 6

Elektrophoretische Trennung eines Aminosäuren-Gemisches.  $p_H \sim 2$ ; 60 Volt/cm, 1,1 mA/cm Streifenbreite; Soletemp.  $-7^\circ C$ ; Laufzeit 200 min

Aminosäuren oder Peptiden wurden je 50  $\gamma$  aufgetragen und hernach mit Ninhydrin in Butanol angefärbt. Die Laufstrecken der einzelnen Komponenten zeigt die cm-Skala.

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Glycin unter den in Bild 6 angegebenen Bedingungen beträgt 3 mm/min. Die Trennung der 9 Komponenten im Versuch Bild 7 ist bereits nach  $\frac{3}{4}$  h praktisch vollständig (7a); nach  $3\frac{1}{2}$  h sind alle Komponenten weit auseinander gezogen (7b).

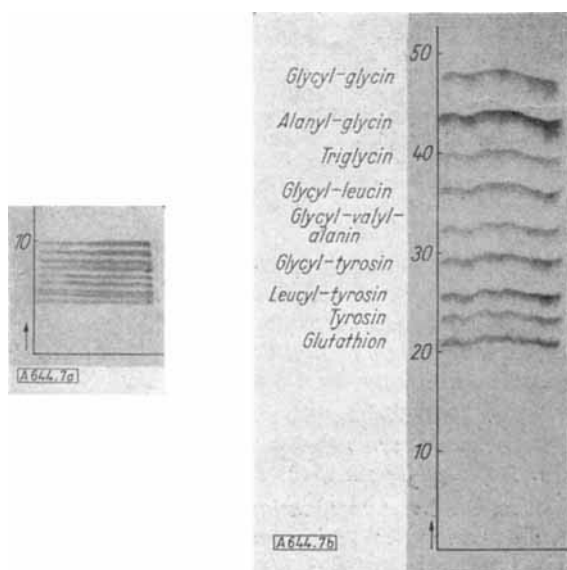


Bild 7

Trennung eines Peptid-Gemisches. a)  $p_H \sim 2$ ; 60 Volt/cm, 1,1 mA/cm Streifenbreite; Soletemp.  $-11^\circ C$ ; Laufzeit 45 min. b) wie a); jedoch Laufzeit 210 min

Die folgenden Testmischungen von Aminosäuren und Peptiden wurden ebenfalls in 2n Essigsäure/0,6n Ameisensäure ( $p_H \sim 2$ ) innerhalb von 2–3 h vollständig aufgetrennt.

Reihenfolge der Wanderungsgeschwindigkeiten:

I	II
Glycyl-leucin	Glycyl-tyrosin
Leucyl-glycin	Leucyl-tyrosin
Diglycyl-leucyl-glycin	Glycyl-leucyl-alanin
Leucyl-diglycin	Glycyl-valyl-alanin
Leucyl-triglycin	Glutaminylglycin
Glutathion	β-Alanyl-glycyl-glycin
	III
	γ-Aminobuttersäure
	β-Aminobuttersäure
	α-Aminobuttersäure

Das Elektropherogramm in Bild 8 zeigt die Auftrennung eines Phenol-Extraktes aus menschlichem Urin. Angefärbt wurde, wie in Bild 9a, b, mit einem Ninhydrin-ähnlichen Reagens, einem Triketo-piperidin-Derivat, welches Dr. W. Heffe an unserem Institut entwickelt hat<sup>80)</sup>.



Bild 8

Elektropherogramm eines Urinkonzentrates.  $p_H \sim 2$ ; 60 Volt/cm; 1,1 mA/cm Streifenbreite; Soletemp.  $-7^\circ C$ ; Laufzeit 210 min

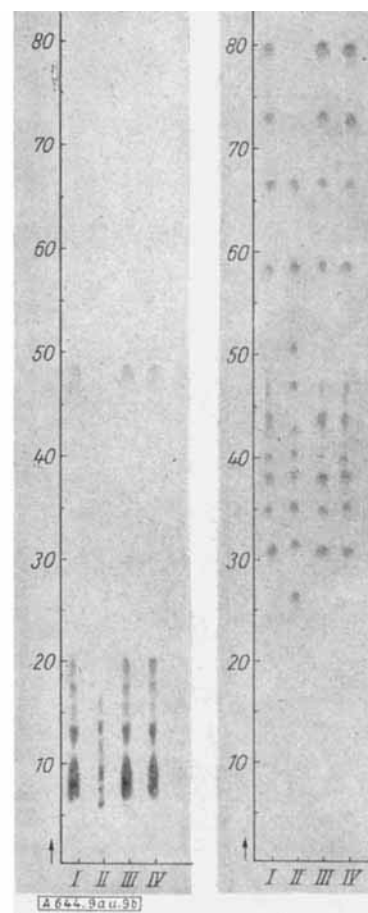


Bild 9

Elektropherogramme von Hydrolysaten bakterieller Proteine. I. von *E. coli*, III. *S. paratyphi B* (Glattform), IV. *S. paratyphi B* (Rauhform), II. Gemisch authentischer Aminosäuren wie in Bild 6, ohne Taurin.  $p_H \sim 2$ ; 70 Volt/cm, 1,2 mA/cm Streifenbreite; Soletemp.  $-18^\circ C$ ; Laufzeit a) 60 min, b) 240 min

Mit der alkoholischen Lösung des Reagenses geben  $\alpha$ -Aminosäuren und Peptide himmelblaue, weitgehend stabile Färbungen. Eine anodisch wandernde und 14 kathodisch wandernde Banden werden so erkennbar. Unter der UV-Lampe sind weitere 4 kathodisch und 5 anodisch wandernde Komponenten feststellbar. Basische Aminosäuren und Amine sind bereits aus dem 60 cm langen Streifen ausgewandert.

<sup>80)</sup> W. Heffe, in Vorbereitung.

In den Bildern 9a und 9b sind Elektropherogramme von Hydrolysaten bakterieller Proteine (I, III, IV) dargestellt. Zum Vergleich ließen wir das Aminosäuren-Gemisch wie in Bild 6 mitlaufen. Bei den Proteinen handelt es sich um Extrakte aus *E. coli* (I) und *Salmonella paratyphi* B, Stamm Kröger (O-Glatt-(III) und o-Rauhform (IV)), deren Zusammensetzung verglichen und identisch befunden wurde. In Bild 9a ist die Trennung der neutralen und basischen Aminosäuren nach 60 min Laufzeit noch unvollständig; bei der schnellwandernden Komponente (bei cm 48) handelt es sich um Ammonium-Ion. In Bild 9b ist die Auftrennung weiter fortgeschritten: Glycin und Alanin sind jetzt ca. 8 cm auseinander gezogen, das Ammonium-Ion ist nach 240 min aus dem Streifen herausgewandert (Wanderungsweg 190 cm). Über die Identifizierung der einzelnen Komponenten soll in einer gesonderten Arbeit berichtet werden.

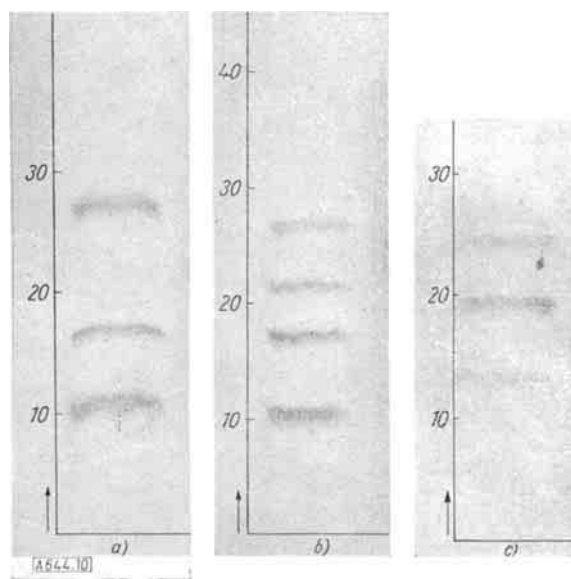


Bild 10  
Trennung von Zuckergemischen in Borax

Glucose  
Mannose  
Rhamnose  
50 Volt/cm, 1,7 mAmp/  
cm Streifenbreite;  
Soletemp. - 8 °C;  
Laufzeit 225 min

Glucose  
Gulose  
Ribose  
Digitoxose  
30 Volt/cm, 0,8  
mAmp/cm Streifen-  
breite; Soletemp.  
- 3 °C; Laufzeit  
420 min

Dioxyaceton  
Mannose  
Digitoxose  
35 Volt/cm, 1,0  
mAmp/cm Streifen-  
breite; Soletemp.  
- 4 °C; Laufzeit  
400 min

Wie seit langem bekannt, bilden Zucker und andere Polyhydroxyl-Verbindungen mit Borsäure Komplexe<sup>31)</sup>, die im elektrischen Feld anodisch wandern<sup>11-13, 15-27)</sup>. In den Bildern 10a, b und c werden Trennungen verschiedener Zuckermischungen gezeigt. Von jedem Zucker wurden ca. 100  $\gamma$  aufgetragen. Als Elektrolyt verwendeten wir 0,08

<sup>31)</sup> J. Boesecken: Adv. Carbohydrat Chem. 4, 189 [1949].

molare Borax-Lösung; angefärbt wurde mit Anilin/Phthalsäure in Butanol.

Wir unternahmen u. a. auch einige orientierende Versuche mit anorganischen Ionen. Die entsprechenden Salze wurden mit einer Platinöse (ca. 0,5 mm<sup>2</sup>, entsprechend 10  $\gamma$  Salz) punktförmig aufgetragen. Wir verwendeten die Acetate von Cu<sup>II</sup>, Cd<sup>II</sup>, Pb<sup>II</sup> und Co<sup>II</sup> sowie die Sulfate von Fe<sup>II</sup> und Fe<sup>III</sup> in 2n Essigsäure/0,6n Ameisensäure (pH ~2). Bild 11 zeigt das Ergebnis

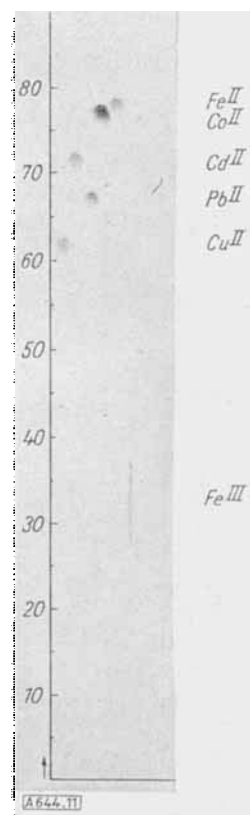


Bild 11  
Papierelektrophorese anorganischer Ionen. pH ~2; 65 Volt/cm, 1,15 mAmp/cm Streifenbreite; Soletemp. -15 °C; Laufzeit 220 min; Anfärbung mit Schwefelwasserstoff/Ammonsulfid

eines solchen Versuchs. Es ist unter den genannten Versuchsbedingungen nicht möglich, aus den bekannten Werten für die Ionenbeweglichkeit<sup>32)</sup> auf die Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese zu schließen. Bemerkenswert ist die Ausbildung eines ca. 10 cm langen, in Wanderungsrichtung weisenden Striches bei Fe<sup>III</sup>.

Dem Werkstattleiter unseres Institutes, J. Schäuble, sind wir zu großem Dank für geschickte und unermüdliche Hilfe bei der Herstellung der Apparaturen verpflichtet. — Dr. B. Kickhöfen am gleichen Institut danken wir für wiederholten Rat bei der Ausführung der Versuche.

Prof. Dr. Th. Wieland stellte uns in liebenswürdiger Weise viele der genannten synthetischen Peptide für Trennversuche zur Verfügung, wofür wir ihm bestens danken.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat die Untersuchungen in dankenswerter Weise wesentlich durch Gewährung eines Stipendiums (an Dr. G. Werner) gefördert.

Eingeg. am 28. Februar 1955 [A 644]

<sup>32)</sup> J. D'Ans u. E. Lax: Taschenbuch f. Chemiker u. Physiker, 2. Aufl., S. 1237, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949.