

DISPOSITIF D'ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER

par

G. BISERTE

*Institut de Recherches sur le Cancer et Laboratoire de Chimie Biologique de la
Faculté de Médecine, Lille (France)*

Les différences entre les vitesses de migration dans un champ électrique sont couramment utilisées pour séparer des substances difficiles à purifier par d'autres méthodes physiques ou chimiques. On donne généralement le nom d'*ionophorèse* à la migration d'ions relativement petits, tandis que le terme d'*électrophorèse* est réservé aux molécules de grande taille et aux particules microscopiques (MARTIN ET SYNGE¹).

De nombreuses techniques ont été proposées et SVENSSON² distingue d'une façon générale les appareils à compartiments et les dispositifs à frontières mouvantes. Dans le premier type d'appareils, la nature des membranes qui séparent les compartiments joue un rôle primordial et l'une des difficultés consiste dans le choix de ces membranes ou des cloisons poreuses qui en tiennent lieu; de plus, il est souvent malaisé de maintenir le p_H constant dans l'ensemble de l'appareil. Dans la technique des frontières mouvantes, la stabilisation des frontières peut être réalisée par la pesanteur (électrophorèse type "TISELIUS"). L'avantage de ce procédé est de permettre le repérage optique et l'identification des constituants d'un mélange complexe, — de plusieurs protéines, par exemple —; mais la séparation des substances reste imparfaite. Cela tient tout d'abord au principe même de la méthode: on ne peut, en effet, isoler en une seule opération que les fractions migrant le plus rapidement et le plus lentement dans le champ électrique (par exemple, les albumines et les globulines γ dans le sérum sanguin), car, dans la région moyenne, les fractions chevauchent plus ou moins les unes sur les autres. D'autre part, la superposition de zones de concentrations différentes favorise la diffusion et les corps de mobilités voisines sont obtenus très difficilement à l'état pur.

Aussi la stabilisation des frontières par des substances pulvérulentes ou par des gels a-t-elle été préconisée pour les essais de séparation; il est évident qu'on sacrifie alors les avantages considérables du repérage optique. COOLIDGE³ emploie des tubes remplis de poudre de verre; mais ceux-ci ont l'inconvénient de présenter une grande résistance au passage du courant. CONSDEN, GORDON ET MARTIN⁴ séparent les amino-acides sur un gel de silice ajusté à un p_H déterminé et coulé sur une plaque de verre de façon à lui donner la forme d'un parallélépipède de faible hauteur; les compartiments à électrodes, placés aux deux extrémités du gel, sont continuellement irrigués par une solution-tampon qui enlève les produits acides ou basiques formés au contact des électrodes et qui maintient intacte la composition ionique du gel. Cette méthode permet de séparer des quantités de substance de l'ordre de une à deux millimolécules. Cependant, une complication importante provient du fait que le déplacement observé est en réalité la résultante de l'action du champ électrique et de l'électroosmose. De plus, la récupération des produits séparés est incomplète par suite de leur adsorption irréversible sur

le gel de silice. HALL⁵ a modifié légèrement le dispositif de CONSDEN ; il recueille notamment le tampon qui irrigue les compartiments à électrodes, afin d'y récupérer les substances (amino-acides) qui auraient pu quitter le gel. BUTLER ET STEPHEN⁶ ont recours à un autre procédé de stabilisation. Leur appareil d'électrophorèse séparative est un tube en matière plastique de 1 mètre de longueur, rempli avec de la fibre d'amiant, du coton, ou de la laine de verre, et compartimenté par des rondelles de papier-filtre. Ce dispositif a permis de réaliser des séparations de peptides et de protéines.

Nous trouvant nous-même devant le problème de l'isolement des polypeptides résultant de l'hydrolyse pepsique des protéines*, nous avons été amené à modifier la technique de CONSDEN en utilisant tout simplement le papier-filtre comme agent de stabilisation des frontières.**

La séparation s'effectue sur des bandes rectangulaires de papier-filtre*** qui remplacent le gel de silice. Le papier a l'avantage de ne pas adsorber irréversiblement les polypeptides ; il permet, en outre, l'utilisation d'une échelle de p_H très souple et très étendue. Enfin, le mode opératoire est nettement simplifié. On évite tout d'abord la préparation du gel, toujours délicate ; ensuite la localisation des substances se fait facilement et directement sur une bande de papier témoin, à l'aide de réactions appropriées.

DESCRIPTION DU DISPOSITIF

L'appareil est inspiré de celui de CONSDEN⁴ : il est entièrement construit en plaques de verre de 5 mm d'épaisseur (Fig. 1) ; l'étanchéité des différents compartiments est assurée uniquement par de la vaseline. L'écoulement de l'eau de refroidissement (a) et des solutions-tampons des compartiments (b et c) se fait *séparément* et directement dans

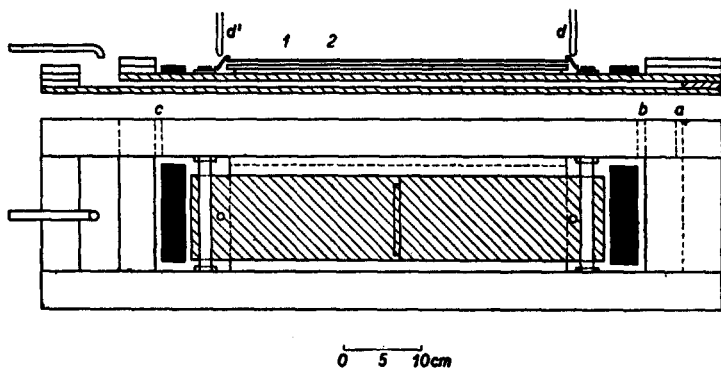


Fig. 1

* Rappelons que l'étude électrophorétique de ces polypeptides (BOULANGER ET BISERTE⁷) permet de les classer en trois groupes électrochimiquement différents, que nous avons appelés respectivement "neutre", "acide" et "basique".

** Notre mémoire était à l'impression quand nous avons eu connaissance de deux articles de WIELAND ET FISCHER (*Naturwiss.*, 35 (1948) 29. — *Angew. Chem.*, 60 A (1948) 313, où se trouve décrite une technique comportant certains points communs avec celle que nous proposons. En fait, elle consiste à remplacer par le courant électrique l'action de la phase organique mobile dans la chromatographie sur papier, et le mode opératoire conserve les avantages et les limitations de cette dernière méthode. Notre procédé se rattache au contraire directement à l'électrophorèse sur gel de silice de Consdén et coll. ; il poursuit le même but, avant tout "préparatif", et vise, en réalisant un fractionnement de base, à simplifier l'analyse ultérieure, — par d'autres moyens, — de mélanges polypeptidiques complexes. Cf. aussi HAUGAARD ET KRONER, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 2135.

*** Le papier Whatman no. 1, préconisé pour la chromatographie de partage, nous a donné entière satisfaction.

une gouttière placée latéralement le long de l'appareil. Deux plaques de verre 1 et 2 servent à surélever le plan des bandes de papier par rapport au niveau du liquide contenu dans les compartiments à électrodes. La plaque inférieure 2 est plus étroite ce qui crée une gouttière réunissant les deux compartiments à électrodes où les liquides restent ainsi constamment au même niveau. L'horizontalité de l'ensemble est d'ailleurs très soigneusement vérifiée. Les solutions-tampons (tampon phosphate M/15 ou acétate M/5) sont amenées par les ajutages d et d' et le débit est réglé à une goutte par seconde. L'anode est en charbon et la cathode en cuivre.

La source de courant est constituée par un redresseur muni d'un filtre, qui peut débiter un courant continu variant de 100 à 400 volts. Un voltmètre et un milliampère-mètre permettent de préciser à chaque instant les conditions expérimentales.

MARCHE DE L'EXPÉRIMENTATION

Nous procédons de deux façons différentes.

A. *Première variante* (pour les expériences de courte durée). La plaque No. 1 est recouverte d'une couche mince et uniforme de paraffine*. On prépare une ou plusieurs bandes de papier de longueur égale à celle de la plaque 1 et de largeur variable (2 à 10 cm) suivant les modalités expérimentales. Au milieu de chaque bande, on découpe une bandelette de 6 à 7 mm de largeur (Fig. 1). On dissout les produits à séparer dans le tampon de p_H voulu et on imprègne la bandelette de cette solution. Lorsque la solubilité des substances est faible, on se sert d'un tampon plus dilué et on humecte la bandelette à plusieurs reprises en attendant chaque fois que la plus grande partie de l'eau soit évaporée (cette opération peut se faire dans une étuve). Les bandes de papier sont imbibées de solution-tampon et déposées sur la plaque de verre paraffinée, en évitant la formation de bulles d'air et de plis. Les bandelettes sont alors mises en place à l'endroit précis où elles avaient été découpées.

Des ponts de papier assurent, aux deux extrémités, le contact avec les compartiments à électrodes. Enfin, une plaque de verre est placée au-dessus des bandes de papier, à une distance de 4 mm. La circulation du tampon et de l'eau de refroidissement est mise en route et soigneusement réglée, et l'on fait alors passer le courant.

Lorsque l'opération est terminée**, les bandes de papier sont retirées et déposées sur une plaque de verre chaude et immédiatement séchées à l'étuve à 100°.

Sur une des bandes ou sur une fraction de bande, on peut alors effectuer directement les réactions spécifiques appropriées (ninhydrine***, — biuret avec la liqueur de FEHLING, — PAULY, etc.).

B. *Deuxième variante* (à utiliser de préférence pour les expériences de longue durée). La plaque 1 est recouverte d'une couche de paraffine de 1 mm et les bandes de papier sont préparées comme précédemment. Lorsqu'elles sont en place, on coule direc-

* Une solution de paraffine dans le xylol est versée sur la plaque soigneusement dégraissée et séchée; l'évaporation du solvant laisse une couche de paraffine très mince et régulière.

** Pour suivre la marche de l'électrophorèse, on peut placer à côté de la bande de papier principale, une ou deux bandes plus étroites que l'on retire en cours d'expérience et que l'on révèle immédiatement. D'autre part, quand on a affaire à des substances fluorescentes, on peut opérer en chambre noire, sous le contrôle d'une lampe à vapeur de mercure munie d'un verre de WOOD.

*** Lorsqu'on effectue la réaction à la ninhydrine sur des bandes de papier imprégnées de solutions-tampons dont le p_H est supérieur à 7, il est recommandé soit d'utiliser de la ninhydrine acide (CONDEN*), soit d'attendre 10 à 12 heures avant de procéder à la localisation définitive des différentes zones.

tement sur elles de la paraffine sous une épaisseur d'environ 2 mm. Cette précaution est destinée à éviter l'évaporation et les appels d'eau qui auraient tendance à se produire des compartiments à électrodes vers le milieu des bandes de papier; ces courants liquidiens peuvent en effet contrecarrer la migration due à l'action du champ électrique. A la fin de l'électrophorèse, la paraffine s'enlève très facilement et on poursuit l'opération comme il est indiqué plus haut.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Nous présentons quelques exemples de résultats expérimentaux obtenus au moyen de la technique que nous proposons.

1. Fractionnement de base d'un mélange d'acides-amino

La solution à analyser contient 2 mg de chacun des amino-acides suivants: acide aspartique, acide glutamique, glycocolle, thréonine, alanine, proline, histidine, arginine. On a recours à la deuxième variante de la méthode. Les compartiments à électrodes sont perfusés avec un tampon phosphate M/15 de p_H 7.2.

L'électrophorèse est poursuivie pendant 3 heures (360 volts — 40 milliampères*) sur deux bandes de papier de 8 cm de largeur.

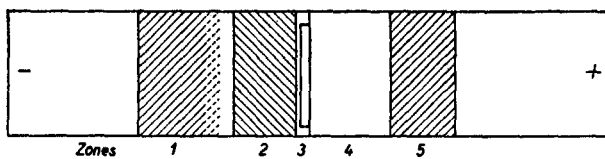


Fig. 2

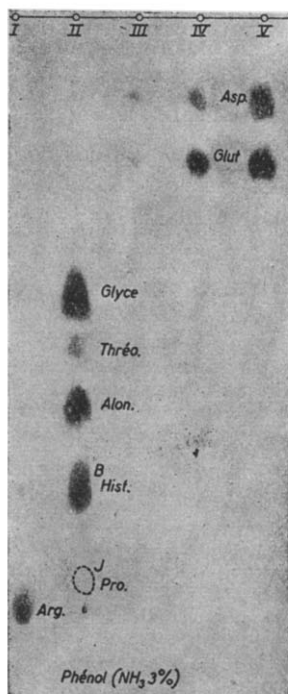


Fig. 3

Bibliographie p. 421.

Après révélation à la ninhydrine d'une fraction de bande, on constate la disposition suivante (Fig. 2):

a. une zone anodique (ninhydrine⁺⁺⁺) de 4 cm de large, qui a migré de 7.5 cm vers l'anode** : zone 5;

b. entre cette zone anodique et le point de départ (bandelette), une zone 4 où la réaction à la ninhydrine est moins fortement positive;

c. les bandelettes où il n'y a plus qu'une réaction très faible: zone 3;

d. une zone cathodique de 4 cm de large où la réaction à la ninhydrine est orangée et qui a migré de 2.5 cm vers la cathode: zone 2;

e. une zone cathodique de 5 cm qui a migré de 8.5 cm: zone 1.

D'après ces indications, le reste des bandes est découpé et les acides aminés sont élués suivant la méthode de DENT⁸. Une fraction des éluats est soumise à la chromatographie de partage sur papier (CONSDEN *et coll.*⁹); solvant: phénol (NH_3 3%). L'aspect du chromatogramme (Fig. 3) révèle que les zones 5 et 4 contiennent uniquement les acides aspartique

* Avant la mise en place des papiers, il passe un courant de 20 milliampères dans la gouttière réunissant les deux compartiments à électrodes.

** Le déplacement des zones est mesuré à partir de leur milieu (CONSDEN⁴).

et glutamique, — que la zone 3 ne renferme plus que des traces d'acides dicarboxyliques, — que la zone 2 groupe les amino-acides suivants: glyco-colle ($p_{\text{H}} : 6.1$), thréonine ($p_{\text{H}} : 6.1$); alanine ($p_{\text{H}} : 6.1$); proline ($p_{\text{H}} : 6.4$); histidine ($p_{\text{H}} : 7.6$); qu'il y a dans la zone 1 de l'arginine ($p_{\text{H}} : 10.8$) avec des traces d'histidine et de glyco-colle.

En laissant l'électrophorèse se prolonger pendant six heures et en opérant à p_{H} 7.0, il est possible de séparer une zone cathodique qui comprend l'arginine, la lysine et l'histidine; dans la zone anodique, on repère également une fraction, — la plus proche de l'anode —, qui donne une réaction bleutée avec la ninhydrine et qui, en chromatographie de partage, se révèle être composée presque uniquement d'acide aspartique.

2. Séparation de l'acide glutamique et de l'acide aspartique

En opérant avec du tampon acétate M/10 de p_{H} 3.0 pendant 9 heures, sous 400 volts, on peut fractionner un mélange de 3 mg d'acide aspartique et d'acide glutamique. En effet, après révélation à la ninhydrine, on observe:

a. une zone anodique de 7 cm de large qui a migré de 5.5 cm et qui, vérifiée par chromatographie, ne contient que de l'acide aspartique;

b. une zone cathodique de 5 cm de large qui a migré de 2.3 cm vers la cathode, et qui est uniquement constituée par de l'acide glutamique.

3. Séparation de la leucylglycine et de la glycine

5 mg de leucylglycine et de glycine sont soumis à l'électrophorèse pendant 6 heures, sous 400 volts, en tampon pyrophosphate M/30 de p_{H} 9.5. Après révélation, deux zones anodiques apparaissent: l'une de 7 cm de large, qui a migré de 10.5 cm et qui contient la leucyl-glycine, — l'autre, qui a 4.5 cm de large et qui a migré de 2 cm vers l'anode*: elle donne une réaction rougeâtre à la ninhydrine et la chromatographie montre qu'elle est formée exclusivement de glyco-colle.

On voit par ces expériences-types que notre dispositif d'électrophorèse sur papier donne des résultats en tous points comparables à ceux de CONSDEN⁴. La simplicité de sa mise en œuvre lui confère un avantage certain et nous pensons qu'il est susceptible de rendre de multiples services, en particulier dans l'étude des produits d'hydrolyse des protéines.

RÉSUMÉ

L'auteur décrit un dispositif de séparation électrophorétique des amino-acides et des polypeptides utilisant le papier-filtre comme agent de stabilisation des frontières; l'appareil est facile à construire et la méthode, très simple, présente de sérieux avantages, notamment pour la récupération des différentes fractions. Des exemples de fractionnement de mélanges-types d'acides-amino sont donnés.

SUMMARY

The author describes a procedure for the separation of aminoacids and peptides by electrophoresis with filter-paper as stabilizing agent; the apparatus can be built very easily and the method is very simple and advantageous, particularly for the recovery of the different fractions. Examples are given of the fractionation of standard-mixtures of amino-acids.

* Lorsqu'on utilise la première variante de la méthode, il peut arriver que les contre-courants dus à l'évaporation entravent la migration anodique du glyco-colle et l'entraînent même de quelques centimètres vers la cathode; ce fait ne présente pas d'inconvénients dans le cas présent.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser beschreibt eine Arbeitsweise zur elektrophoretischen Trennung von Aminosäuren und Polypeptiden wobei Filterpapier als Stabilisator benutzt wird. Die Apparatur ist einfach aufzubauen und die Methode weist bedeutende Vorzüge auf, insbesondere was die Wiedergewinnung der einzelnen Fraktionen betrifft. Als Beispiel wird die Fraktionierung einiger Standardmischungen von Aminosäuren beschrieben.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Advances in Protein Chem.*, 2 (1945) 31.
- ² H. SVENSSON, *Advances in Protein Chem.*, 4 (1948) 251.
- ³ T. B. COOLIDGE, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 551.
- ⁴ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 40 (1946) 33.
- ⁵ D. A. HALL, *Nature*, 162 (1948) 105.
- ⁶ J. A. V. BUTLER ET J. M. L. STEPHEN, *Nature*, 160 (1947) 469; *Biochem. J.*, 42 (1948) X.
- ⁷ P. BOULANGER, G. BISERTE ET J. SWYNGEDAUF, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 302.
- ⁸ C. E. DENT, *Biochem. J.*, 41 (1947) 240.
- ⁹ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.

Reçu le 7 avril 1949