

A modification of Polson's simultaneous electrophoresis technique

Some time ago POLSON^{1,2} suggested carrying out two or more electrophoretic analyses in a Tiselius cell simultaneously by inserting cellophane membranes between the channel part and the electrode vessels and using descending boundaries only. As this technique seemed promising, a study of its conditions was undertaken. It was found that membranes of different cellulosic materials had several drawbacks:

(a) Because of their high ratio of wall to pore volume their electrical resistance is comparatively large, resulting in heat development and reduction of the potential difference along the cell channels.

(b) They show a pronounced electro-osmotic activity causing trouble by buffer striae invading the channels from the bottom part.

(c) As they are more or less impermeable to proteins, a strong protein gradient is built up against the membrane during analysis, thus obstructing part of the channels.

(d) Because of their high flow resistance, it is not possible to bring the initial boundaries into the field of view. POLSON accordingly used the boundary-sharpening technique by syringe suction.

These difficulties may be overcome by using as a membrane a thin layer of agar or gelatin jelly which is mechanically supported by forming it on filter paper. A layer about 0.3 mm thick of a 1% agar jelly is sufficiently tight to serve as a quite effective membrane, its electrical resistance being at the same time relatively low and giving no heat trouble. On the other hand its lower flow resistance as compared with that of the cellulosic membranes enables the initial boundaries to be lowered into the field of view by applying a pressure of about 10–20 mm Hg. Electro-osmosis if present may easily be compensated for, either by a higher fluid level on the cathode side when using an open type cell, or better still by using the closed type cell of Longworth. In order to counteract any tendency of buffer solution from the bottom part to interfere with the channel contents it was, however, found practical to make the density of the bottom part solution somewhat higher than that of the channels by adding some high-molecular substance to it, for example a protein or polysaccharide.

Membranes of the type described may be used for several days when kept wet. They have the additional advantage that because of the excess jelly they need no grease to form a tight joint between two flat surfaces.

The technique described has been applied to the Kern micro-electrophoresis apparatus, model LK 30³. An "exploded" view of the cell construction is shown in Fig. 1. In order to facilitate filling operations the membrane was not applied between the channel and the bottom part of the cell, but the latter was vertically divided into two parts between which the membrane could be clamped. In this manner the membrane is protected from damage by the syringe needle during filling of the channels, and trapping of air bubbles is easily avoided. Furthermore, should any of the solution filling the bottom part behind the membrane penetrate through the latter by electro-osmosis, it will not become visible immediately in the field of view.

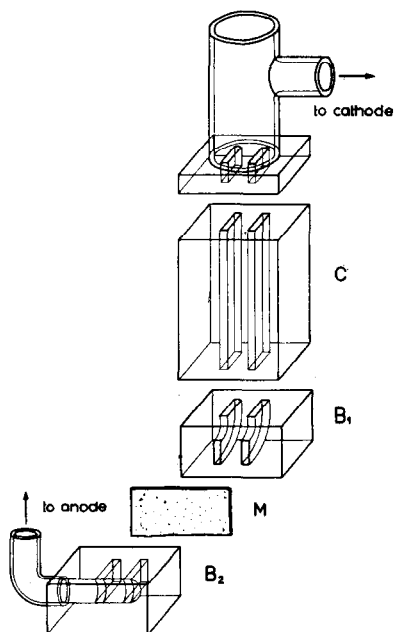


Fig. 1. Cell construction. C channel part, B₁ B₂ bottom parts, M membrane.

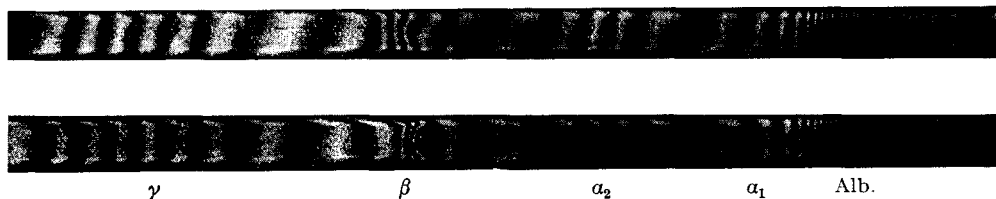


Fig. 2. Interferograms of the same normal human serum analysed simultaneously. Michaelis buffer pH 8.6, 6.5 V/cm, time 45 min.

As already remarked by POLSON, refilling of the channel part may be done without changing the solution in the bottom part, and this will result in a reduction of the cycle period. In this manner

it has been possible to effect 16 analyses in 8 hours. Fig. 2 shows two diagrams of the same serum run simultaneously.

It may finally be mentioned that agar jelly membranes as described can be used as filters. A hot solution of agar may for example be washed in this manner.

W. LOTMAR

Research Laboratory, Kern & Co. Ltd., Aarau (Switzerland)

¹ A. POLSON, *Nature*, 168 (1951) 996; 170 (1952) 628.

² A. POLSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 451.

³ W. LOTMAR, *Rev. Sci. Instr.*, 22 (1951) 886; *Plasma*, 1 (1953) 209.

Received February 4th, 1955

Untersuchungen mit Radiophosphor zum Stoffwechsel zweier verschiedener Fraktionen der Desoxyribonucleinsäure am Walker-Carcinom der Ratte

In neuerer Zeit ist es auf verschiedene Weise gelungen, die Desoxyribonucleinsäure (DNS) eines Gewebes in mehrere differente Fraktionen zu zerlegen¹⁻⁷. So gelang es BENDICH^{1,2,3}, aus verschiedenen Organen der Ratte nach schonender Isolierung zwei DNS-Fraktionen zu gewinnen, von denen die eine (DNS₁) in 0.87 %-iger Kochsalzlösung ausfällt, während die andere (DNS₂) in Lösung bleibt. Mit Hilfe radioaktiv markierten Formiats konnte BENDICH zeigen, dass diese beiden DNS-Fraktionen in einem Organ verschieden grosse Umsatzraten haben, also in unterschiedlicher Menge pro Zeiteinheit neugebildet werden. Dieser Befund verdient besonderes Interesse, da die DNS wesentlicher Bestandteil des genetischen Materials im Zellkern ist.

In eigenen Versuchen wurde das von BENDICH angegebene Fraktionierungsverfahren³ angewandt, um die Wirkung von Röntgenstrahlen auf die DNS-Synthese im Walker-Carcinom der Ratte zu untersuchen. Durch Röntgenstrahlen wird bekanntlich die Neubildung der DNS gehemmt^{8,9,10}. In unseren Versuchen wurde Wistar-Ratten mit subcutan transplantiertem Walker-Carcinom* Radiophosphor (³²P) als Orthophosphat intraperitoneal injiziert. Bei den bestrahlten Tieren (isolierte Bestrahlung der Tumoren jeweils mit 5000 r bei 180 kV, 10 mA, 0.5 mm Cu gefiltert; Dosisleistung 290 r/min) wurde die Injektion unmittelbar nach der Bestrahlung vorgenommen. Die Tötung der Tiere erfolgte jeweils 2 Std. nach der Injektion, um so die frühzeitige Strahlenwirkung und bei der Bewertung der Befunde zuverlässig den anabolischen Teil des DNS-Umsatzes zu erfassen¹¹.

Die Ergebnisse, welche in Tabelle I zusammengefasst sind, zeigen, dass nach 2 Std. im ungestört wachsenden Tumor die beiden DNS-Fraktionen praktisch gleich viel ³²P eingebaut haben. Unter dem Einfluss von Röntgenstrahlen wird jedoch die Neubildung der DNS₂ stärker gehemmt als die der DNS₁. Die Synthesehemmung durch ionisierende Strahlen trifft demnach im Walker-Carcinom die DNS keineswegs gleichmässig. Dieser Befund bestätigt zugleich, dass die beiden nach dem Verfahren BENDICH's isolierten DNS-Arten stoffwechselfähig verschiedenartige Fraktionen darstellen.

TABELLE I

VERGLEICH DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN (MITTELWERTE MIT STANDARDABWEICHUNGEN)
VON DNS₁ UND DNS₂ IM UNBESTRAHLTEN UND IM RÖ-BESTRAHLTEN WALKER-CARCINOM DER RATTE
Einzelheiten zur Methodik, insbesondere zur Isolierung der Nucleinsäuren in ausreichender radiochemischer Reinheit, werden an anderer Stelle ausführlich beschrieben¹².

	Zahl der Versuchstiere	Spezifische Aktivität (Zählrohrimpulse/min, mg P)		Verhältnis der spezif. Aktivitäten DNS ₁ /DNS ₂
		DNS ₁	DNS ₂	
Ungestört wachsender Tumor	7	5 220 ± 300	5 160 ± 480	1.0
Bestrahlter Tumor	8	2 550 ± 160	2 080 ± 120	1.23 (P < 0.01)

Die an normalen Geweben der Ratte durchgeführten Untersuchungen BENDICH's hatten ferner gezeigt, dass in Organen mit hoher Mitoserate die DNS₁ mengenmässig im allgemeinen überwiegt

* Das Walker-Carcinom wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. HOEPKE, Direktor des Anatomischen Instituts der Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt.