

## Dünnschicht-Chromatographie auf Linienglas

Von allen chromatographischen Trennmethoden hat in der letzten Zeit besonders die Dünnschicht-Chromatographie die grösste Bearbeitung gefunden und eine rapide Ausweitung erfahren. STAHL<sup>1</sup> kommt vor allem das Verdienst zu, die Bedeutung und die Möglichkeiten der Dünnschicht-Chromatographie richtig erkannt und in Weiterführung der ersten Ansätze<sup>2</sup> dieses Trennverfahrens durch eine sorgfältige Ausarbeitung von technischen Details so standardisiert zu haben, dass es allgemein anwendbar ist und mit relativ geringer Anlernzeit von den Laboratorien der verschiedensten Forschungsrichtungen mit Erfolg übernommen werden konnte. – Eine der wichtigsten Voraussetzungen zur Erzielung von brauchbaren und auch reproduzierbaren Ergebnissen bei der Dünnschicht-Chromatographie ist die Gewinnung von dünnen und vor allem gleichmässigen Adsorbens-Schichten. Nachdem STAHL einen einfachen und sehr gut funktionierenden Streichapparat beschrieben hatte<sup>1,3</sup>, sind eine ganze Reihe von Einrichtungen zur Erzielung von dünnen, gleichmässigen Schichten im Handel erschienen, die zum Teil auch gestatten, die Schichtdicke zu variieren.

Im folgenden möchten wir über eine technische Modifikation der Dünnschicht-Chromatographie berichten, bei der die Schichtdicke der Trägermasse nicht durch einen Streichapparat, sondern durch die Oberflächenbeschaffenheit der Glasperle selbst bestimmt wird. Im Glashandel lässt sich nämlich sogenanntes Linienglas leicht beschaffen, das verschiedene Rillentiefe aufweist. Wir haben ein solches, aus Belgien stammendes Glas für diese modifizierte Dünnschicht-Chromatographie mit Erfolg eingesetzt, das wir uns entsprechend der in Figur 1 angegebenen Spezifikationen haben zuschneiden lassen.

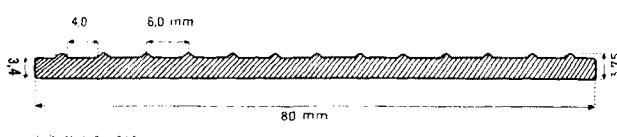


Fig. 1

**Vorbereitung der Platten:** Auf 4 Platten (von je 80 mm Breite) bzw. 8 halben Platten (von je 40 mm Breite), die – gut gereinigt und namentlich entfettet – Schmalseite gegen Schmalseite als Band auf Zeitungspapier ausgelegt sind, wird die Suspension von 20 g Kieselgel (z. B. Kieselgel G «Merck») und 40 ml Wasser, die in verschlossenen Erlenmeyer 30 sec kräftig geschüttelt worden war<sup>2</sup>, in Schlangenlinie aufgegossen und mit einer geeigneten Streicheinrichtung (siehe Figur 2) gleichmässig verteilt.

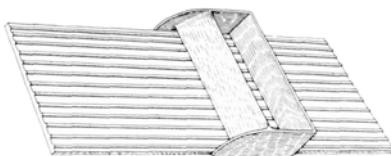


Fig. 2

Nach etwa 1–2 min hat die Trägermasse etwas «angezogen», das heisst sie ist heller geworden, worauf mit Hilfe eines breiten Metallspachtels das auf den Rillen des Linienglases haftende überschüssige Adsorbens gründlich abgeschabt wird. Dies wiederholt man, nachdem die Platten während 15 bis 20 h zum Trocknen an der Luft gelegen haben. Eine anschliessende Aktivierung ist nicht

nötig: die Platten sind lufttrocken direkt verwendbar. Vor Gebrauch werden die Ränder der Platten mit Daumen und Zeigefinger vom anhaftenden Kieselgel befreit. Es empfiehlt sich, die beiden äussersten der 12 bzw. 6 Bahnen jeweils unbenutzt zu lassen, da dort «Randeffekte» eine grössere oder kleinere Wanderungsgeschwindigkeit bewirken.

Als *Trennkammern* benützen wir die im Handel überall leicht erhältlichen Sterilisiergläser (Einmachgläser), deren Innenwand vom Boden bis zur Verjüngung des Glases mit einem Filtrierpapierstreifen ausgekleidet und durch das Elutionsmittel adhäsiv fixiert wird. Eine rasche Kammer-sättigung lässt sich vor dem Einbringen der Glasplatten leicht durch kurzes Schütteln der verschlossenen und mit den üblichen Gummiringen gedichteten Sterilisiergläser erzielen. Das Auftragen der Substanzproben geschieht wie üblich. In jeder Kammer lassen sich gleichzeitig zwei Platten unterbringen (siehe Figur 3).

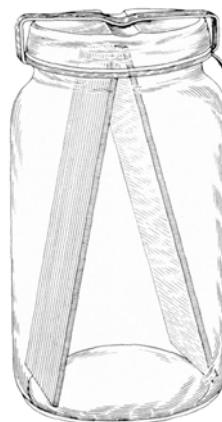


Fig. 3

Die Vorteile der hier beschriebenen Modifikation der Dünnschicht-Chromatographie sind die folgenden: (1) Die Grundausstattung lässt sich mit ausserordentlich geringem Kostenaufwand beschaffen. Es kann sich jeder an seinem Arbeitsplatz einen Satz von 3–4 Kammern mit verschiedenen Lösungsmittelsystemen stets griffbereit vorrätig halten. (2) Die als Kammern benützten Sterilisiergläser schliessen dank ihrer Gummiringe absolut dicht. Ein hermetischer Verschluss ist erfahrungsgemäss nur mit Hilfe solcher Dichtungen zu erzielen. (3) Die Rillen verhindern ein seitliches Ausbrechen der wandernden Substanzen. (4) Die einzelnen Substanzproben können sehr nahe nebeneinander aufgetragen werden und sind nach dem Entwickeln der Platten nur etwa 2 mm (durch die Glasperlen) voneinander getrennt, wodurch ein Vergleich der Wanderungsstrecken der einzelnen Substanzen wesentlich erleichtert wird.

Die Dünnschicht-Chromatographie auf Linienglas lässt sich natürlich nicht zweidimensional handhaben. Auch sind die erzielten Rf-Werte nicht immer reproduzierbar. Dies ist aber bei gleichzeitigem Auftragen von Vergleichs-

<sup>1</sup> E. STAHL, Chemiker-Z. 82, 323 (1958); Angew. Chemie 73, 646 (1961).

<sup>2</sup> Diesbezügliche Literaturangaben siehe bei M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, Exper. 16, 378 (1960).

<sup>3</sup> Herstellung und Vertrieb des Streichgerätes erfolgt durch C. Desaga GmbH, Heidelberg.

substanzen ohne Bedeutung. Die Dünnschicht-Chromatographie auf Linienglas ist unseres Erachtens in erster Linie wegen ihrer Einfachheit und Billigkeit geeignet, mit Vorteil überall dort eingesetzt zu werden, wo es wünschenswert ist, sich über die Reinheit und Einheitlichkeit einer Substanz rasch zu informieren<sup>4</sup>.

**Summary.** A modification of the thin layer chromatography on grooved chromatoplate is described, which

reduces the usual equipment to a very simple and inexpensive extent.

A. GAMP, P. STÜDER, H. LINDE und KUNO MEYER

Pharmazeutisches Institut der Universität Basel (Schweiz),  
11. April 1962.

<sup>4</sup> Dem Schweizerischen Nationalfonds danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Classification of *Micrococcus (Staphylococcus aureus)* by Means of Differences in Electrophoretical Mobility of Extractable Proteins

It is possible to classify *Staphylococcus aureus* by means of different biological and immuno-chemical reactions: phage-typing, agglutination and gel-precipitation have been used<sup>1</sup>. Corresponding to every individual immuno-chemical reaction, which is used specifically to the types of the bacteria, there must be a series of specific components in the micro-organism which probably possess differences in physico-chemical properties as well as differences in immunological properties. After the development of the electrophoretical technique for micro scale procedures (agar-gel-micro-electrophoresis)<sup>2</sup>, it was therefore adjacent to try to demonstrate whether staphylococci containing non-identical immunological components revealed differences in the electrophoretical mobilities.

**Material and Methods.** The objects of the investigation were the three types, Cowan I, II, and III (phage-group I, II, and III). The bacteria were cultivated in agar medium for 24 h. The culture was scraped off and washed three times with saline (the bacteria being isolated each time by centrifugation at 10 000 rpm). The culture from one plate was finally suspended into 10 ml buffer (9 ml 1/15 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 ml 1/15 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). After 14 day's standing at room temperature, the suspension was centri-

fuged and the supernatant was subjected to an electrophoretical investigation after concentration by vacuum dialysis.

The agar-gel-micro-electrophoresis was performed as described by WIEME<sup>2</sup>. The protein pattern was stained by amido black, also as described by WIEME<sup>2</sup>.

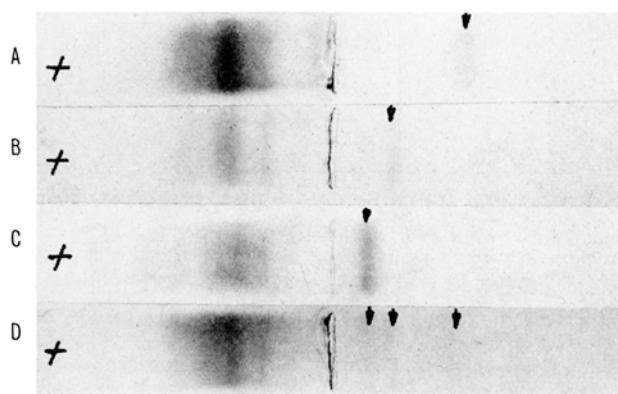
**Results and Discussion.** The Figure demonstrates the agar-gel-micro-electrophoresis of the extractable proteins from the three types of Cowan. Each type possesses, in the  $\beta$ - $\gamma$ -area, a protein fraction specific of the type, but different in mobility from type to type. By pooling the three extracts from the three types, it is demonstrated that the three fractions have different mobilities.

Probably it is possible by means of differences in mobility of extractable proteins, revealed in agar-gel-micro-electrophoresis, to use this method for typing the bacteria. Thus this method could be used additionally to the typing by COWAN by means of agglutination and precipitation reactions<sup>3,4</sup>, a method which has later been extended by modified immuno-chemical reactions<sup>5-7,8</sup>. It is quite reasonable that further differences between the different types of staphylococci can be revealed in agar-gel-micro-electrophoresis, especially in the fractions localized in the  $\alpha$ -area, but the results from this area seem to be more difficult to interpret without an exact determination of the relative mobilities of the different fractions (as described by WIEME<sup>2</sup>).

**Zusammenfassung.** Mit Agar-Gel-Mikroelektrophorese war es möglich, typenspezifische Unterschiede in Mobilitäten von löslichen Proteinen der drei Typen, *Staphylococcus aureus*, «Cowan», zu demonstrieren. Diese Methode kann wahrscheinlich zur Typenbestimmung von Staphylococci und anderen Bakterien benutzt werden.

P. ROSENKAST and J. CLAUSEN

University Institute of Biochemistry, Copenhagen (Denmark), January 19, 1962.



Agar-gel-micro-electrophoresis of soluble proteins from Staphylococci from Cowan group I, II, and III. A: Cowan group II. This group of Staphylococci possesses the slowest moving  $\gamma$ -fraction. B: Cowan group I. This group of Staphylococci contains a  $\gamma$ -globulin-fraction with slow  $\beta$ -2-mobility. C: Cowan group III. This group of Staphylococci contains a distinct fraction with  $\beta$ -1-mobility. D: Cowan group I, II, and III pooled. All three fractions in the  $\beta$ - $\gamma$ -area are visible.

<sup>1</sup> K. JENSEN, Thesis E. MUNKSGAARD, Copenhagen (1959).

<sup>2</sup> J. WIEME, Thesis Arscia, Bruxelles (1959).

<sup>3</sup> S. T. COWAN, J. Path. Bact. 46, 31 (1938).

<sup>4</sup> S. T. COWAN, J. Path. Bact. 48, 169 (1939).

<sup>5</sup> R. CHRISTIE and V. KEOGH, J. Path. Bact. 51, 181 (1940).

<sup>6</sup> B. HOBBS, J. Hyg. 46, 222 (1948).

<sup>7</sup> E. KRAG ANDERSEN and B. HEILESEN, Acta dermat.-venerol. 31, 671 (1951).

<sup>8</sup> P. OEDING, Acta path. microbiol. scand. 41, 310 (1957).