

## Methodik und Anwendungen der Elektrophorese

VON E. WIEDEMANN

Chemisch-pharmazentisches Laboratorium «Sandoz» (Prof. Dr. A. STOLL), Basel<sup>1</sup>

Die Elektrophorese, wie sie aus den führenden, seit 1937<sup>2</sup> mitgeteilten Untersuchungen von A. TISELIUS hervorgegangen ist, stellt eine in den letzten Jahren zu hoher Vollkommenheit entwickelte Methode dar, die es ermöglicht, Stoffe von großem bis sehr großem Molekulargewicht, sofern sie durch eine elektrische Ladung charakterisiert sind, in rohem oder gereinigtem Zustande zu trennen, quantitativ zu bestimmen und zu charakterisieren, ohne sie dabei zu verändern. Hierzu wird ihre Lösung unter passend gewählten und stationären Bedingungen der Wirkung eines elektrischen Feldes ausgesetzt. Die elektrisch geladenen Stoffteilchen bewegen sich dann entsprechend der Art und Größe ihrer Ladung und im allgemeinen unabhängig voneinander. Es hat sich gezeigt, daß auch bei sehr nahe verwandten Stoffen der Unterschied der Ladungen zumeist recht erheblich ist, so daß ein gegebenes elektrisches Feld fast immer recht verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten zur Folge hat. So sind mittels der Elektrophorese Unterscheidungen und Trennungen ermöglicht worden, die auf andere Weise nicht oder kaum auszuführen waren. Da die Eigenladungen und damit Wanderungsgeschwindigkeit und Wanderungsrichtung der in Frage kommenden Stoffe innerhalb ihres *pH*-Stabilitätsbereiches durch Änderung der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus variierbar sind, ist es möglich, das Auflösungsvermögen der Elektrophorese durch *pH*-Variationen zu steigern. Auch die abermalige Wauderung elektrophoretisch abgetrennter Fraktionen unter Änderung der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus kann diesem Zwecke dienen.

Als besonders gut geeignetes Objekt der Untersuchung war schon sehr bald die große und wichtige Körperklasse der Proteine und Proteide erkannt worden, nachdem H. PICTON und S. E. LINDER<sup>3</sup> 1892 zur Feststellung gelangt waren, daß Hämoglobin, ein typisches Chromoprotein, in einem elektrischen Felde wandert. In der Tat liegen bei Proteinen und ihren

Verwandten die Verhältnisse infolge ihrer Wasser- bzw. Pufferlöslichkeit sowie ihrer mit dem *pH* des Milieus variablen Eigenladungen im allgemeinen recht günstig. Es gelang bald, durch Reihenversuche unter Änderung der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus von wichtigen Proteinen, wie z. B. Ovalbumin, charakteristische *pH*-Beweglichkeitskurven zu erhalten<sup>4</sup>. Bei Proteinen, die umgeladen werden können, ohne auszuflocken (Albumine), durchläuft diese Kurve einen Beweglichkeitswert Null, nach W. B. HARDY<sup>5</sup> also den isoelektrischen Punkt, dessen *pH*-Zahl eine für das betreffende Protein charakteristische Konstante darstellt. Sie ist später durch die Definition der Neigung der Beweglichkeitskurve am isoelektrischen Punkt, also den Wert  $\frac{du}{dpH_0}$ , verfeinert worden<sup>6</sup>.

Die Heranziehung der Elektrophorese zu den verschiedensten Untersuchungen, vorwiegend auf dem Gebiet der Proteinforschung, ist indessen jüngeren Datums. Sie wurde wesentlich gefördert durch den auf den Arbeiten von A. TISELIUS fußenden Ausbau der schlierenoptischen Beobachtungsmethode durch O. LAMM<sup>7</sup>, J. ST. L. PHILPOT<sup>8</sup>, L. G. LONGSWORTH<sup>9</sup> und H. SVENSSON<sup>10</sup>, womit sich zusätzlich die quantitative Bestimmung der im Elektrophoreseversuch anwesenden hochmolekularen Stoffe mit großer Genauigkeit ermöglichen ließ. Damit war es gelungen, die Elektrophorese insbesondere auch zur Leitung und Kontrolle chemischer Methoden der Isolierung und Reindarstellung von Proteinen und Proteiden heranzuziehen, sowie quantitative Analysen von Proteingemischen, wie sie z. B. in Körperflüssigkeiten (Plasma usw.) vorliegen, auszuführen. Die erhebliche analytische Bedeutung der Elektrophorese spiegelte sich alsbald in einem enormen Anwachsen der diesbezüglichen Literatur wider, worauf noch zurückzukommen sein wird.

<sup>1</sup> A. TISELIUS, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis **4**, 7, No. 4 (1930).

<sup>2</sup> W. B. HARDY, J. Physiol. **24**, 288 (1899); **33**, 251 (1905).

<sup>3</sup> Vgl. z. B.: THE SVEDBERG und KAI O. PEDERSEN, Die Ultrazentrifuge, Tab. 48, S. 368 ff., Steinkopff, Dresden und Leipzig 1940.

<sup>4</sup> O. LAMM, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis **10**, 6 (1937).

<sup>5</sup> J. ST. L. PHILPOT, Nature **141**, 283 (1938).

<sup>6</sup> L. G. LONGSWORTH, Ann. Acad. Sci. (New York) **39**, 105 (1939).

<sup>7</sup> H. SVENSSON, Koll.-Z. **87**, 181 (1939); **90**, 141 (1940).

<sup>1</sup> Zum Teil nach zwei Vorträgen des Verfassers am 20. November 1946 vor der Naturforschenden, Chemischen und Medizinischen Gesellschaft Basel und am 16. Januar 1947 vor der Chemischen Gesellschaft, der Biochemischen Vereinigung und dem Ärzteverein Bern.

<sup>2</sup> A. TISELIUS, Trans. Faraday Soc. **33**, 524 (1937); Koll.-Z. **83**, 129 (1938); Svensk Kem. Tidskr. **50**, 58 (1938); Harvey Lectures **35**, 37 (1939/40).

<sup>3</sup> H. PICTON und S. E. LINDER, J. Chem. Soc. **61**, 148 (1892).

Zunächst sei bemerkt, daß es gegenwärtig möglich ist, in einem Elektrophoreseversuch von wenig mehr als einer Stunde Dauer mit etwa 100 mg eines Proteingemisches, das in 10–12 cm<sup>3</sup> Puffer gelöst ist, eine Analyse durchzuführen, die mit einer Genauigkeit von mindestens  $\pm 0,5\%$  die Mengen der einzelnen unterscheidbaren Komponenten ergibt, wobei als weitere Angabe deren Beweglichkeitswerte mit noch höherer Sicherheit erhalten werden.

Im folgenden soll gezeigt werden, mit welchen Hilfsmitteln und auf welche Weise dieses Ergebnis erzielt wird. Anschließend sei kurz auf einige weitere Anwendungsmöglichkeiten der Elektrophorese eingegangen.

Die geforderte Konstanz aller Versuchsbedingungen (Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration, Stromstärke usw.) sowie die Notwendigkeit einer möglichst genauen Registrierung des Wanderungsvorganges der empfindlichen Grenzflächen von meist farblosen Stoffen im elektrischen Felde setzt eine recht weitgehende Durchbildung der apparativen Hilfsmittel voraus, wie sie verschiedentlich<sup>11</sup> vorgenommen worden ist. Die nachfolgende Abb. 1 zeigt die vom Verfasser 1946 konstruierte und seither im physikalisch-chemischen Laboratorium der Sandoz AG, Basel in Gebrauch stehende Elektrophorese-Apparatur<sup>12</sup>.

Zwischen zwei starr miteinander verbundenen, in schwerer Ausführung gehaltenen Laboratoriumstischen ist ein Glas-Thermostat angeordnet, der vermittle der darunter sichtbaren, durch zwei elektrische Temperaturregler in Differentialschaltung gesteuerten Kühlmaschine sehr genau ( $\pm 1/50^\circ$ ) auf der für die Versuche erforderlichen Temperatur der größten Dichte der Untersuchungslösung (etwa  $+ 0,5$  bis  $+ 2^\circ$ ) gehalten wird. In diesem Thermostaten findet das U-Rohr nach A. TISELIUS<sup>13</sup> mit seinen Zusatzteilen Verwendung; die Form und Größe dieser Teile richtet sich nach der Art der auszuführenden Messung oder Trennung. In der nachfolgenden Abb. 2 ist eine dreiteilige Standard-Zelle mit den dazu passenden geschlossenen Elektrodengefäßen wiedergegeben, wie sie jetzt vorwiegend für analytische Bestimmungen benützt wird.

Die U-Röhre nach A. TISELIUS sind aus planparallelen Glasplatten aufgebaut und besitzen rechteckigen Querschnitt, um eine optisch einwandfreie Beobachtung und Registrierung der Versuche sowie eine gute Ableitung der JOULEschen Wärme zu ge-

währleisten. Entweder die untere Hälfte oder einer der Schenkel (einschließlich des Bodenteils) wird mit der Untersuchungslösung, also der Lösung der Proteine in Puffer, gefüllt, während der übrige Teil der Zelle sowie die Elektrodengefäße einschließlich der verbindenden Glasrohre mit reiner Pufferlösung, wie sie zum Lösen der Proteine diente, beschickt werden.

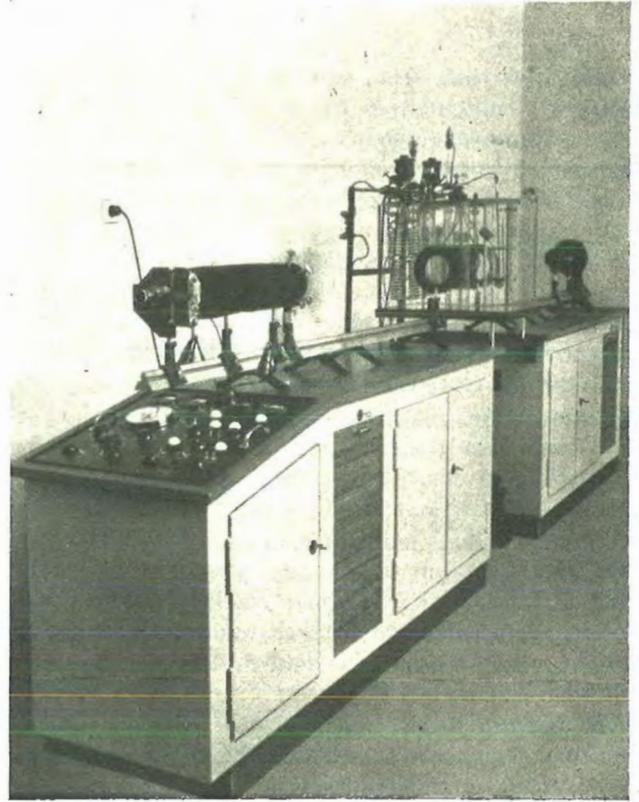


Abb. 1

Untersuchungslösung und Pufferlösung werden zunächst, durch Verschieben der Zellenabschnitte gegeneinander nach dem Einfüllen der Untersuchungslösung, getrennt gehalten, bis der Temperaturengleich im Thermostaten erreicht ist. Stellt man dann durch vorsichtiges Öffnen der Zelle mittels der kleinen Pumpen oder einer diesen entsprechenden mechanischen Einrichtung des Zellenhalters die Kommunikation her, so bilden sich zwei Grenzflächen zwischen Untersuchungslösung und Pufferlösung aus, deren Wanderungsgeschwindigkeit und Wanderungsrichtung nach Anlegen einer Gleichspannung in der Größenordnung von 100–200 Volt (bei analytischen Versuchen) an die beiden Elektroden aus Feinsilber mit Hilfe spezieller optischer Methoden verfolgt und aufgezeichnet wird. Der große Abstand zwischen Untersuchungslösung und Elektroden<sup>14</sup> garantiert dabei die Aufrechterhaltung stationärer Milieubedingungen innerhalb des Wanderungsbereiches,

<sup>11</sup> In Schweden: Elektrophorese-Apparaturen nach TISELIUS-SVENSSON, hergestellt von L. K. B. Produkter, Stockholm; in England: nach A. S. MCFARLANE, hergestellt von Ad. Hilger, London; in den USA: nach L. G. LONGSWORTH, hergestellt von Klett Mfg. Co., New York; in der Schweiz: nach E. WIEDEMANN, hergestellt von Strübin & Co., Basel.

<sup>12</sup> Vgl. auch: E. WIEDEMANN, *Experientia* 3, 341 (1947).

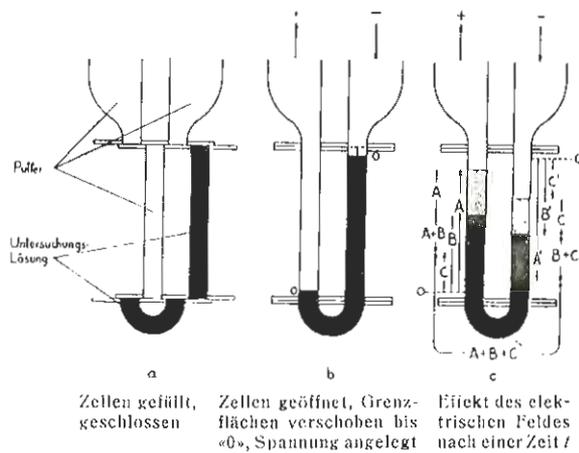
<sup>13</sup> A. TISELIUS, *Trans. Faraday Soc.* 33, 524 (1937); *Koll.-Z.* 83, 129 (1938).

<sup>14</sup> Vgl. W. PAULI und K. LANDSTEINER, *Verh. 25. Kongr. inn. Med.* S. 57 (1908).

sofern neben der Versuchstemperatur auch die Stromstärke genau konstant gehalten wird. Hierfür ist, da der Strom dem Netz entnommen wird, ein sehr gut stabilisierter Gleichrichter vorgesehen, der unter dem Schaltpult (vgl. Abb. 1) eingebaut ist und vermittels der links dort sichtbaren Drehknöpfe zu Beginn des Versuches auf die gewünschte Spannung und Stromstärke eingestellt wird. Die elektrischen Daten werden durch zwei Präzisionsmeßinstrumente angezeigt. Die Versuchszeit, deren Kenntnis zur Berechnung der Wanderungsgeschwindigkeit bzw. Beweglichkeit erforderlich ist, wird automatisch in Sekunden und auf eine Zehntelsekunde genau registriert. Diese Vervollkommnung der Hilfseinrichtungen gestattet dem Experimentator, während des Versuches seine volle Aufmerksamkeit den Vorgängen in der Zelle zuzuwenden.

Es sei bemerkt, daß der Thermostat einer ganz erschütterungsfreien Aufstellung bedarf, da die Grenzflächen der Lösungen mechanisch sehr empfindlich sind. Aus diesem Grunde ist es erforderlich, die Hilfseinrichtungen des Thermostaten (Kühlwinden, Rührmotoren usw.) ohne Berührung mit diesem darin aufzuhängen.

Der häufigste Fall der gleichsinnigen Wanderung eines Gemisches ist in der nachfolgenden Abb. 3 für drei Komponenten dargestellt. Abb. 3 a zeigt die gefüllte und durch seitliches Verschieben des unteren Zellenabschnitts geschlossene Zelle, Abb. 3 b die Zelle nach ihrer Öffnung und in Abb. 3 c ist der Effekt des elektrischen Feldes nach einer gewissen Zeit aufgezeichnet. Dadurch, daß sich die einzelnen Komponenten des Gemisches weitgehend unabhängig voneinander und hauptsächlich entsprechend ihrer verschiedenen großen Eigenladungen verschieden schnell be-



A b b. 3. Schematische Darstellung der gleichsinnigen Wanderung dreier Komponenten im elektrischen Feld

wegen, kommt eine entsprechende Schichtung und partielle Trennung zustande, so daß zumindest die schnellste und langsamste Komponente je zu einem Teil für sich allein erhalten werden können.

Die Beobachtung und Registrierung der Vorgänge in der Elektrophoresezelle ist nur dann ohne spezielle optische Einrichtungen möglich, wenn es sich um gefärbte Stoffe handelt. Sind die Substanzen aber ungefärbt, wie es bei Proteinen der Fall ist, so müssen besondere Vorkehrungen zur Sichtbarmachung der Grenzflächen getroffen werden. Von den beiden dafür in Betracht kommenden optischen Methoden, der interferometrischen und der Schlierenmethode, hat sich die letztere, obschon sie etwa viermal weniger empfindlich ist<sup>15</sup>, besonders gut den gegebenen Verhältnissen anpassen lassen, so daß heute alle Elektrophorese-Apparaturen damit ausgerüstet werden.

Die Schlierenmethode von A. TOEPLER<sup>16</sup>, die auf zwei von L. FOUCAULT<sup>17</sup> angegebenen Prinzipien beruht, nützt den Umstand aus, daß die bei streifender Durchstrahlung von Grenzflächen, zufolge der dort gegebenen Brechungsindex-Änderung, gegen das dichtere Medium hin abgelenkten Strahlenbündel ausgeblendet werden können, so daß der Beobachter bei zweckmäßiger Anordnung des Strahlenganges und einer Blende die Grenzflächen als dunkle Querstreifen im hellen Bilde der Zelle sieht.

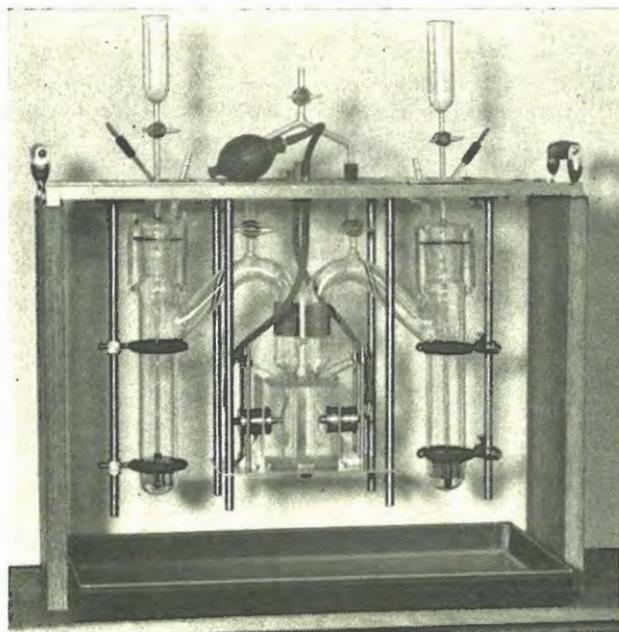
Praktische Anwendung findet diese ursprüngliche Abbildungsmethode für Brechungsindexgradienten<sup>18</sup> indessen nicht mehr, weil es möglich war, ihre Leistungsfähigkeit durch einige geschickt gewählte Modifikationen noch erheblich zu steigern. Diese Modifikationen zielen dahin, den ganzen Verlauf jeder einzelnen Brechungsindexänderung, wie sie auf einer Konzentrationsänderung beruht und dieser proportional ist, zur Aufzeichnung zu bringen und damit

<sup>15</sup> G. HANSEN, Zeiß-Nachr. 3. Folge, S. 302 (1939/40).

<sup>16</sup> A. TOEPLER, Beobachtungen nach einer neuen optischen Methode, Bonn 1864; Pogg. Ann. 127, 556, 128, 126 (1866); 131, 33, 180 (1867); 134, 194 (1868).

<sup>17</sup> L. FOUCAULT, Ann. Observatoire Imp. Paris 5, 197

<sup>18</sup> Vgl. A. TISELIUS, Koll.-Z. 83, 129 (1938). [(1859).



A b b. 2

Konzentrationsbestimmungen zu ermöglichen, die zumeist noch erheblich wichtiger sind als die Messungen elektrophoretischer Beweglichkeiten.

Drei Varianten des TOEPLERSchen Schlierenverfahrens sind bekanntgeworden, welche die Aufzeichnung des Verlaufs von Konzentrationsgradienten erlauben: die Skalenmethode von O. LAMM<sup>19</sup>, die «Schlieren scanning method» von L. G. LONGSWORTH<sup>20</sup> und die Methode der direkten Diagrammaufzeichnung von PHILPOT-SVENSSON<sup>22</sup>. Davon ist die Methode von O. LAMM die genaueste; leider weist sie den Nachteil auf, in ihrer Auswertung recht mühevoll zu sein. Dies ist der Grund, weshalb die beiden ande-

Das Zustandekommen des PHILPOT-SVENSSON-Bildes sei anhand der nachfolgenden Abb. 4 wie folgt erklärt:

Das von einer Lichtquelle *L* (Wolframbandlampe mit waagrechttem Band, Gasentladungslampe) ausgehende Strahlenbündel wird mittels einer Kondensorlinse *K* auf einem ersten waagrechttem Spalt *SP*<sub>1</sub> gesammelt. Die Schlierenlinsen *SL*<sub>1</sub> und *SL*<sub>2</sub> (Fernrohrobjektive sehr guter axialer Fehlerberichtigung), deren freier Durchmesser etwas größer als die Höhe der Zelle sein muß, bilden den ersten, waagrechttem Spalt mit bestmöglicher Schärfe auf einen zweiten, schrägen Spalt *SP*<sub>2</sub> in natürlicher Größe

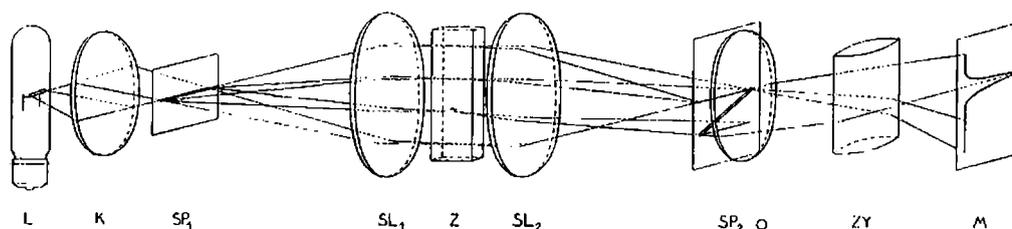


Abb. 4

ren Methoden, jene von L. G. LONGSWORTH hauptsächlich in Amerika und die zuletzt genannte besonders in Europa, eine größere Verbreitung erfahren haben. Wie in speziellen Untersuchungen von L. G. LONGSWORTH<sup>23</sup>, H. SVENSSON<sup>24</sup> und des Verfassers<sup>25</sup> gezeigt werden konnte, ist aber auch die Genauigkeit der letztgenannten Methoden im allgemeinen völlig ausreichend und jener der üblichen analytischen Methoden durchaus ebenbürtig.

Bei der Skalenmethode von O. LAMM wird eine Skala mit etwa 0,5 mm Strichabstand, die sich vor der Zelle befindet, durch diese hindurch photographiert. Lichtablenkungen in der Zelle bewirken Verschiebungen der horizontalen Skalenstriche, die sich sehr genau messen und in Kurven umrechnen lassen und auf diese Weise den Verlauf der Gradienten wiedergeben.

Die «Schlieren scanning method» erreicht eine Gradientenwiedergabe in Form einer Beschattung des hellen Grundes durch Hochziehen einer Schlierenblende unter gleichzeitiger seitlicher Verschiebung der photographischen Platte während der Aufnahme.

und unter achsenparalleler Durchstrahlung der Zelle ab. Das unmittelbar auf den schrägen Spalt *SP*<sub>2</sub> folgende Objektiv *O* erzeugt ein scharfes Bild der Zelle *Z* auf der Mattscheibe *M* bzw. auf der photographischen Schicht. Außerdem wird der schräge Spalt *SP*<sub>2</sub> durch ein Zylinderlinsensystem *ZY* mit vertikaler Achse im Maßstab 1:1 scharf auf die Mattscheibe abgebildet.

Die Kombination dieser drei Abbildungsvorgänge führt wie folgt zum Bilde: Die Zelle unabgelenkt durchtretendes Licht erzeugt ein in Höhe der optischen Achse liegendes Bild des ersten Spaltes auf dem zweiten Spalt. Ist dessen Höhe so eingestellt, wie in Abb. 4 gezeichnet, so tritt nur rückwärts Licht durch diesen Spalt, das, durch das Zylinderlinsensystem nach vorne gebrochen, vorne auf die Mattscheibe fällt. Dabei bildet das Objektiv *O* die Zelle der Höhe nach ab, da in der Vertikalen das Zylinderlinsensystem nur als planparallele Platte wirkt. Der Breite nach wird aber der zweite, schräge Spalt abgebildet, da in der Horizontalen das Zylinderlinsensystem sammelnd bzw. abbildend wirkt. Somit entsteht als Bild einer von Gradienten freien Zelle eine helle, vorne liegende, vertikale Linie, deren Höhe derjenigen der Zelle und deren Breite derjenigen des zweiten Spaltes mal dem Tangens des Winkels, den dieser Spalt mit der Vertikalen bildet, proportional ist.

Entsteht nun in der Zelle ein Gradient, so wird infolge der Lichtablenkung ein zusätzliches Spaltbild auf dem zweiten Spalt erzeugt, das in Richtung des dichteren Mediums, also nach unten, versetzt erscheint. Das hat zur Folge, daß von diesem zusätz-

<sup>19</sup> O. LAMM, *Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis* **10**, 6 (1937).

<sup>20</sup> L. G. LONGSWORTH, TH. SHEDLOVSKY und D. A. MCINNIS, *J. Exper. Med.* **70**, 399 (1939); L. G. LONGSWORTH und D. A. MCINNIS, *Chem. Rev.* **24**, 271 (1939).

<sup>21</sup> J. St. L. PHILPOT, *Nature* **141**, 283 (1938).

<sup>22</sup> H. SVENSSON, *Koll.-Z.* **87**, 181 (1939); **90**, 141 (1940).

<sup>23</sup> L. G. LONGSWORTH, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* **18**, 219 (1946).

<sup>24</sup> H. SVENSSON, *Ark. Kem. Mineral. Geol.* **22**, A, 10, 1 (1946).

<sup>25</sup> F. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta* **30**, 639 (1947).

lichen Spaltbild nur ein in bezug auf das unabgelenkte Licht seitlich versetztes Strahlenbündel den zweiten Spalt durchtreten kann. Da diese seitliche Versetzung (in Abb. 4 nach vorne) durch das Zylinderlinsensystem abgebildet wird, so tritt auf der Mattscheibe eine seitliche Auslenkung der hellen, vertikalen Linie ein, wenn, was immer der Fall ist, der Verlauf der Brechungsindexänderung kontinuierlich erfolgt.

Es sei bemerkt, daß alle drei Varianten des TOEPLERSchen Schlierenverfahrens, die die Aufzeichnung des Gradientenverlaufs gestatten, Vor- und Nachteile aufweisen; so ist die Skalenmethode zwar außerordentlich genau, aber zur Abbildung starker, steiler Gradienten im Gegensatz zu den beiden anderen Methoden weniger gut geeignet, da sich größere Skalenstrichverschiebungen nicht ohne weiteres mit bester Schärfe abbilden lassen. Bei der «Schlieren scanning method» ist die genaue Auswertung des Bildes mühsam, da hierzu die Linie fünfzigprozentiger Schwärzung des Übergangs von Hell nach Dunkel ausgezogen werden muß. Die Methode der direkten Diagrammaufzeichnung bedingt einen größeren Aufwand an optischen Mitteln und ist empfindlich für Abbildungsfehler<sup>26</sup>, ergibt aber ein leicht auswertbares Bild. Ihre Durchbildung hat es indessen ermöglicht, die ursprünglichen Nachteile zu beheben<sup>27</sup>, so daß sie heute als besonders geeignet bezeichnet werden darf, wenn es darauf ankommt, mit möglichst kleinem Aufwand an Arbeit ein größeres Versuchsmaterial zu bewältigen und dabei eine gute Genauigkeit einzuhalten.

Die an einem Elektrophoresebild (vgl. Abb. 5 a und 5 b) zu bestimmenden Größen sind:

1. die Werte der Beweglichkeiten  $u$  ( $v$ ) der einzelnen Komponenten, wobei mit  $u$  die apparente anodische und mit  $v$  die apparente kathodische Beweglichkeit bezeichnet wird, und
2. die relativen (und evtl. absoluten) Mengen der einzelnen Komponenten.

Die Beweglichkeiten  $u$  ( $v$ ) ergeben sich aus den Versuchsdaten nach der Formel:

$$u(v) = \frac{s q z}{I t}, \quad (1)$$

worin  $s$  die durchlaufene Weglänge in cm,  
 $q$  den Querschnitt des U-Rohres in cm<sup>2</sup>,  
 $z$  die spezifische Leitfähigkeit der Untersuchungslösung in  $\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  
 $I$  die Stromstärke in Ampère und  
 $t$  die Zeit in Sekunden bedeutet.

Man gewinnt diese Daten wie folgt: Nach dem Ansetzen des Versuchs (vgl. später) und dem Öffnen der Zelle nach erfolgtem Ausgleich des hydrostatischen Drucks und der Temperatur im Thermostaten

verschiebt man die zunächst hinter den horizontalen Glasplatten der Zelle verborgenen Grenzflächen um einen kleinen Betrag in der zu erwartenden Wanderungsrichtung. Dies geschieht bei offenen Elektrodengefäßen durch Absaugen von ein wenig (etwa 0,5 cm<sup>3</sup>) Pufferlösung mittels eines Kapillarhebers, bei geschlossenen Elektrodengefäßen durch einen nachträglich hergestellten kleinen Druckunterschied. Dann photographiert man sie und zeichnet damit die Ausgangslage des allen Komponenten gemeinsamen Gradienten vor der Wanderung auf. Dann erst legt man Spannung an die Elektroden. Nach Beendigung der Wanderung, also nach Abschalten des Stromes, photographiert man auf die gleiche oder eine zweite photographische Schicht das erhaltene Bild. Man erhält dann die durchlaufenen Strecken  $s$  durch Messung des Abstandes der einzelnen Gradienten vom Ausgangsgradienten, evtl. unter Division durch den Vergrößerungsfaktor der auf genau gleiche Größe gebrachten Bilder. Dabei ist zu beachten, daß bei symmetrischen Gradienten die Scheitelordinate, bei unsymmetrischen dagegen die senkrechte Flächenhalbierende diese Maßzahl korrekt ergibt.

Der Wert  $q$  (Querschnitt des U-Rohres) ist für analytische Elektrophoresezellen normalisiert und beträgt 0,75 cm<sup>2</sup>.

Die spezifische Leitfähigkeit  $z$  der Untersuchungslösung ist jeweils bei der Temperatur des Elektrophoreseversuches zu bestimmen. Bei Proteinlösungen empfiehlt es sich, eine speziell dafür geeignete Meßzelle zu verwenden, wie sie von TH. SHEDLOVSKY<sup>28</sup> oder dem Verfasser<sup>29</sup> vorgeschlagen wird. Die Leitfähigkeitsmeßzelle wird am besten während des Elektrophoreseversuchs im Elektrophorese-Thermostaten benützt; als Meßbrücke ist z. B. das Philips-Instrument GM 4140 in Verbindung mit dem dazu passenden 1000-Hz-Generator GM 4260 geeignet.

Die Stromstärke  $I$  wird zu Beginn des Versuchs passend eingestellt (z. B. auf 10–25 mA bei analytischen Messungen); sie muß über die Dauer des Versuchs genau konstant gehalten werden, was bei der in Abb. 1 wiedergegebenen Apparatur durch die Verwendung eines stabilisierten Gleichrichters erreicht wird.

Die Versuchszeit  $t$  wird dabei automatisch in Sekunden und auf eine Zehntelssekunde genau<sup>30</sup> registriert.

Die relativen Mengen der anwesenden Komponenten ergeben sich wie folgt: Nimmt man an, daß die die Lichtablenkungen bewirkenden Brechungsinkremente  $\Delta n$  der Lösung den sie verursachenden Konzentrationsinkrementen  $\Delta c$  proportional sind, und nimmt man ferner an, daß die Beträge der Lichtab-

<sup>28</sup> Vgl. L. G. LONGSWORTH, TH. SHEDLOVSKY und D. A. McINNES, J. Exper. Med. **70**, 399 (1939).

<sup>29</sup> E. WIEDEMANN, Helv. Chim. Acta **30**, 168 (1947).

<sup>30</sup> Zur Begründung dieses Erfordernisses vgl. E. WIEDEMANN, Helv. Chim. Acta **30**, 639 (1947).

<sup>26</sup> H. SVENSSON, Koll.-Z. **90**, 141 (1940).

<sup>27</sup> E. WIEDEMANN, Helv. Chim. Acta **30**, 639, 648 (1947).

lenkungen  $y$ , vertikal am zweiten Spalt gemessen, den Ablenkungswinkeln  $\delta$  proportional sind (was für die kleinen, praktisch vorkommenden Werte von  $y$  - einige Millimeter und  $\delta$  = einige Bogenminuten immer als erfüllt betrachtet werden darf), so kann man schreiben:

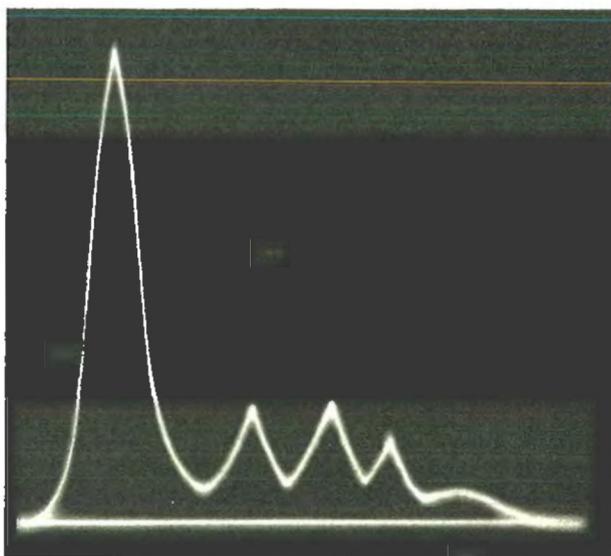
$$y = ab \frac{dn}{dx}, \quad (2)$$

worin  $y$  die Lichtablenkung,  $a$  die Schichtdicke der Lösung (normalerweise = 2,5 cm) und  $b$  den optisch wirksamen Abstand zwischen der Zelle und dem zweiten Spalt bedeutet, der für die optische Anordnung der Abb. 4 gleich der Brennweite der Schlierenlinse  $SL_2$  zu setzen ist.

Hierzu kommt folgendes: Da der Verlauf der Lichtablenkung über einen Gradienten hinweg zufolge der Diffusion der Kolloidteilchen an einer Grenzfläche immer allmählich erfolgt, wobei er vom Wert Null zu einem Maximum ansteigt und von diesem wieder zum Wert Null zurückkehrt, so gilt für die Summe der Lichtablenkung über einen Gradienten hinweg die Beziehung:

$$\int y \cdot dx = \frac{ab}{k} \int \frac{dn}{dx} dx = \frac{ab}{k} (n_2 - n_1), \quad (3)$$

worin  $k$  eine Proportionalitätskonstante bedeutet. Es ist also nicht nur die jeweilige Kurvenhöhe dem



a) Bild

Brechungsindexunterschied und damit dem Konzentrationsunterschied proportional, sondern die von der ganzen Kurve mit ihrer Basis eingeschlossene Fläche gibt dazu als Summenwert aller Brechungs- bzw. Konzentrationsinkremente eine Maßzahl für die Konzentration des gelösten Stoffes. Kann der spezifische Brechwert mehrerer anwesender Stoffe als gleich angenommen werden, wie dies z. B. bei den

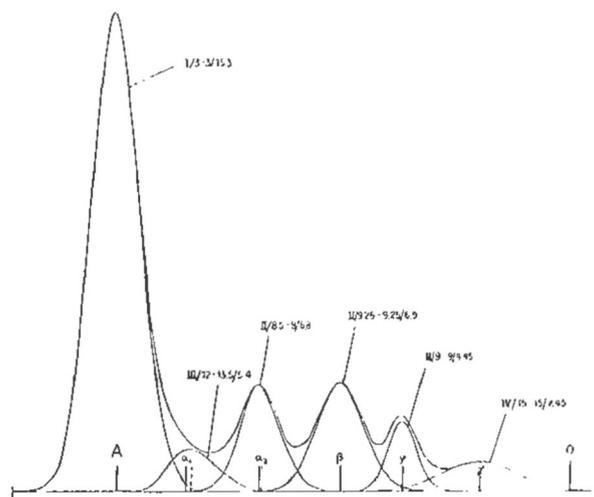
Proteinen des Blutplasmas als zulässig erachtet wird, so ergeben die einzelnen Flächenwerte des Bildes direkt die relativen Konzentrationen bzw. Prozentwerte der einzelnen Komponenten.

Die Bestimmung der absoluten Konzentrationen anwesender Stoffe erfordert natürlich die Kenntnis der spezifischen Brechwerte, die refraktometrisch zu bestimmen sind, sowie der für die Größe des Bildes maßgeblichen Apparaturkonstanten. Für die Anordnung der Abb. 4 zur Aufnahme von PHILPOT-SVENSSON-Diagrammen folgt die absolute Konzentration jeder im Bilde aufgezeichneten Komponente nach der von H. SVENSSON<sup>31</sup> gegebenen Formel:

$$c = \frac{1}{FGKab \operatorname{tg} \theta} \int y \cdot dx, \quad (4)$$

worin  $F$  und  $G$  die Vergrößerungsfaktoren in der Horizontalen (der Zylinderoptik  $ZY$  bei gegebener Stellung derselben) und in der Vertikalen (des abbildenden Objektivs  $O$ ),  $K$  den spezifischen Brechwert der betr. Komponente des Gemisches und  $\operatorname{tg} \theta$  den Tangenswert des Winkels bedeuten, den der schräge Spalt mit der Vertikalen bildet.

Zur Auswertung einer Elektrophorese-Aufnahme, wie sie in Abb. 5 a wiedergegeben ist, geht man am einfachsten so vor, daß man, wie es Abb. 5 b zeigt, die Mittellinie des ganzen Kurvenzuges einschließ-



b) Auswertung (descending boundaries)

Abb. 5

lich der Basis unter Einhaltung eines passenden Vergrößerungsmaßstabes direkt vom Negativ auf ein Blatt Papier auszieht, nachdem man von der Aufnahme vor Beginn der Wanderung die Länge der Basislinie und die Lage der Mitte des Ausgangsgradienten («0») übernommen und eingetragen hat. Dann

<sup>31</sup> H. SVENSSON, Koll.-Z. 87, 181 (1939).

sind zunächst die einzelnen Kurven des Bildes gegeneinander zu extrapolieren, Diese Extrapolation und auch die nachfolgende Flächenbestimmung läßt sich zufolge des Umstandes vereinfachen, daß diese Kurven bei zweckmäßiger Arbeitsweise zumeist streng oder doch in guter Annäherung ideale Verteilungskurven darstellen, in ihrem Verlauf also der von C. F. GAUSS angegebenen Funktion

$$\frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^y e^{-y^2} dy \quad (5)$$

entsprechen. Dies folgt aus dem Umstand, daß die Verteilung der Moleküle an einer Grenzfläche ihrer Lösung gegenüber dem Lösungsmittel durch den Vorgang der freien, ungestörten Diffusion sich auch dann dem idealen Verteilungszustand weitgehend annähert, wenn dieser nicht von vornherein gegeben war, und daß dieser Zustand auch bei der Wanderung der Grenzflächen im Elektrophoreseversuch in guter Annäherung erhalten bleibt, wenn die Versuchsbedingungen (vgl. später) einigermaßen günstig gewählt werden. Man kann daher dem Linienzug des Bildes, am besten durch Überprojektion, normale Verteilungskurven passender Höhe und Halbwertsbreite überlagern und findet damit auch bei sich teilweise überschneidenden Kurven deren ganzen Verlauf (vgl. Abb. 5b). Kennt man die Flächenwerte der überprojizierten Normalkurven mit ihrer Basis, so hat man für den Fall der Kongruenz sofort die Maßzahlen der relativen Prozente jeder der anwesenden Komponenten.

Zwei Auswerteverfahren dieser Art sind bekannt<sup>32, 33</sup>, von denen das letztere genauer und anpassungsfähiger ist, so daß es auch bei komplizierteren Elektrophoresebildern die bisher übliche, mühsame planimetrische Flächenbestimmung in vollen Umfange ersetzen kann.

Da die Erzielung scharfer, gut auswertbarer Elektrophoresediagramme nach PHILPOT-SVENSSON nicht nur eine entsprechend leistungsfähige Apparatur mit vorzüglichen optischen<sup>34</sup>, elektrischen<sup>35</sup> und mechanischen<sup>36</sup> Bestandteilen, sondern auch eine zweckmäßige Arbeitsweise schon beim Ansetzen der Versuche erfordert, seien dieser einige Ausführungen gewidmet. Da die theoretische wie praktische Behandlung der hier hereinspielenden Fragen schwierig und ihre Bearbeitung noch nicht abgeschlossen ist, können an dieser Stelle nur einige allgemeine Richtlinien gegeben werden; der näher daran interessierte Leser wird in den Arbeiten von L. G. LONGSWORTH

und D. A. McINNES<sup>37</sup>, V. P. DOLE<sup>38</sup>, H. SVENSSON<sup>39</sup>, L. G. LONGSWORTH<sup>40</sup> und des Verfassers<sup>41</sup> Angaben finden, die ihm beim Vorliegen einer speziellen Aufgabe deren Lösung erleichtern werden.

Der einfachste Fall liegt vor, wenn die zu untersuchende Substanz (Protein, Proteingemisch usw.) in trockenem, salzfreiem Zustande zur Verfügung steht. Sie wird für den Elektrophoreseversuch dann nur in passender Konzentration (etwa 1—2 %) in einem Puffergemisch von gewünschtem pH-Wert, z. B. 8,5, und der Ionenstärke  $\mu$ <sup>42</sup> = 0,1—0,2 gelöst und nach dem Überschichten mit der gleichen Pufferlösung zur Wanderung gebracht.

Die Verhältnisse komplizieren sich, wenn das zu untersuchende Material nur in Lösung beständig ist oder in Lösung vorliegt, wie es z. B. bei pathologischen Plasmaproben der Fall ist. Man hat dann diese Lösung zunächst bei tiefer Temperatur, z. B. + 2 °, gegen das geeignete Puffergemisch zu dialysieren und die Proteine so in das gewünschte Milieu zu bringen. Man hat zu bedenken, daß dabei die Einstellung des DONNAN-Gleichgewichtes<sup>43</sup> die Erreichung des Lösungsmittel- bzw. Puffermilieus verhindert, so daß im darauffolgenden Elektrophoreseversuch das Milieu der Proteine und die gleiche, überschichtete Pufferlösung nicht ganz identisch sind. Als Folge davon treten im Bilde zusätzliche Puffergradienten auf, die die direkte Bestimmung der Flächenwerte stören. Es kann deshalb zweckmäßig sein, diese Puffergradienten zu unterdrücken, was mit praktisch völlig ausreichender Genauigkeit durch passende Konzentrierung der überschichteten Pufferlösung erreichbar ist<sup>44</sup>.

Für die Wahl der Proteinkonzentration, des pH-Wertes, der Ionenstärke  $\mu$  und der Pufferarten gelten die folgenden Regeln:

Die Proteinkonzentration soll möglichst niedrig sein, damit die an den Proteingrenzflächen auftretenden Leitfähigkeitssprünge und deren Folgen sich in engen Grenzen halten. Die minimal zulässige Konzentration ist einerseits durch das Auflösungsvermögen der Apparatur und der angewendeten Meßmethode, andererseits durch die Art des zu untersuchenden Stoffes bedingt. Bei Gemischanalysen wird eine Gesamtkonzentration von etwa 2 % immer

<sup>37</sup> L. G. LONGSWORTH und D. A. McINNES, *Amer. Chem. Soc.* **62**, 705 (1940).

<sup>38</sup> V. P. DOLE, *J. Clin. Invest.* **23**, 708 (1944).

<sup>39</sup> H. SVENSSON, *Ark. Kem. Mineral. Geol.* **22**, A, 10, 1 (1946).

<sup>40</sup> L. G. LONGSWORTH, *Chem. Rev.* **30**, 323 (1942); vgl. auch G. E. PERLMANN und D. KAUFMAN, *Amer. Chem. Soc.* **67**, 638 (1945).

<sup>41</sup> E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta* **30**, 168 (1947).

<sup>42</sup> Siehe z. B.: W. PAULI und E. VALKO, *Kolloidchemie*, S. 113, Leipzig 1933.

<sup>43</sup> Vgl. W. BLADERGROEN, *Physikalische Chemie*, S. 257, Wepf, Basel 1945.

<sup>44</sup> E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta* **30**, 168 (1947).

<sup>32</sup> H. LABHART, *Experientia* **3**, 36 (1947).

<sup>33</sup> E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta* **30**, 892 (1947).

<sup>34</sup> Vgl. H. SCHARDIN, *VDI-Forschungsh.* 367, Berlin 1934; E. WIEDEMANN, *Experientia* **3**, 341 (1947).

<sup>35</sup> Vgl. E. WIEDEMANN, *Experientia* **3**, 341 (1947).

<sup>36</sup> Vgl. I. c. <sup>35</sup> und E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta* **30**, 648 (1947).

A  $\alpha_1$   $\alpha_2$   $\alpha_3$   $\beta_1$ - $\beta_3$   $\gamma$   $\gamma_1$   $\gamma_2$  (6)      (6)  $\gamma_2$ - $\gamma_1$   $\gamma$   $\beta_3$ - $\beta_1$   $\alpha_3$   $\alpha_2$   $\alpha_1$  A

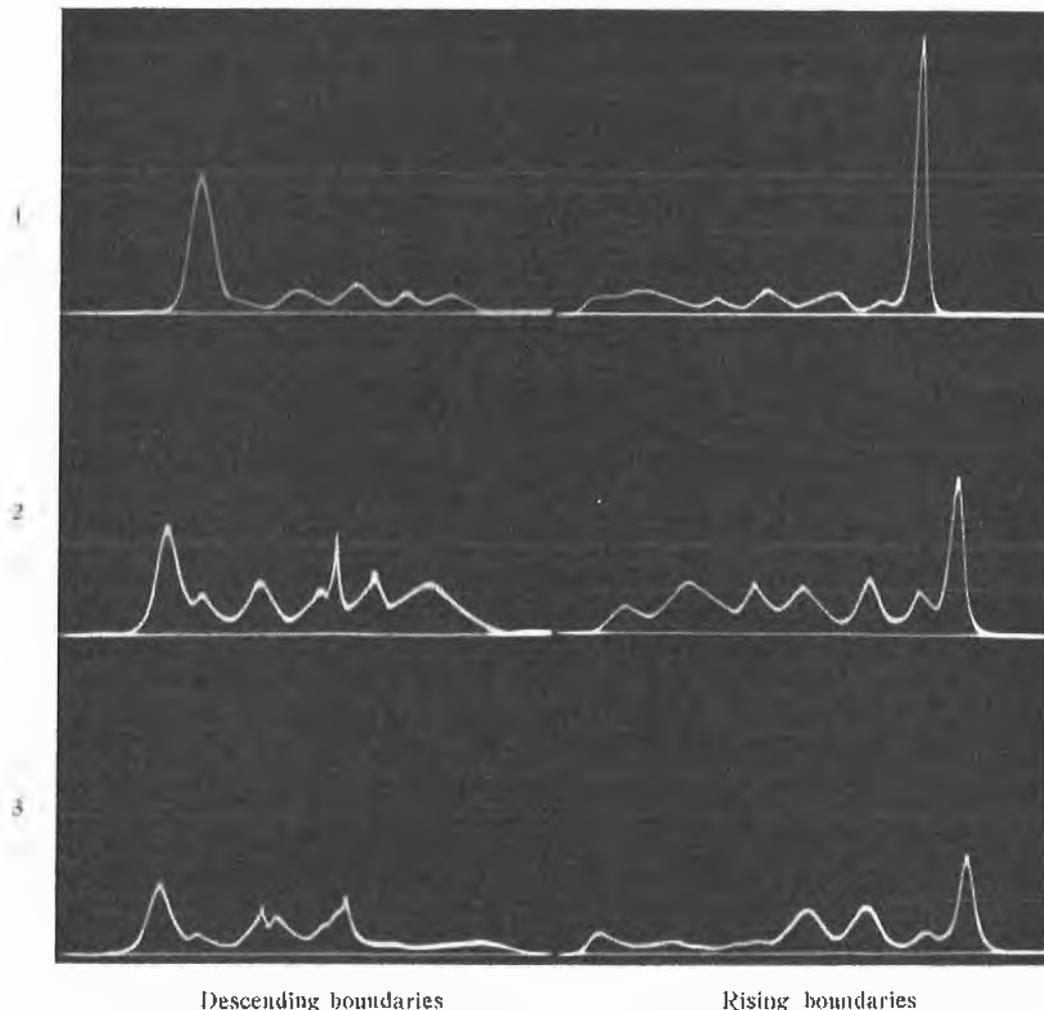


Abb. 6a. Elektrophorese-Diagramme humaner Plasmen  
1 Normales Plasma; 2 Plasma bei chronischer Polyarthritis; 3 Plasma bei Nephrose  
Kleinbild-Aufnahmen

ausreichend sein; bei Anwendung der Skalenmethode mag man auch mit einer Konzentration von 1 % auskommen, da dieses Aufnahmeverfahren besonders zur guten Wiedergabe flacher Gradienten geeignet ist. Eine weitere Herabsetzung der Konzentration ist durchaus möglich, bedingt aber ein gesteigertes Auflösungsvermögen der Apparatur, wie es im allgemeinen nicht gegeben ist.

Die Wasserstoffionenkonzentration wird in der Mehrzahl der Fälle, besonders wenn über die zu untersuchenden Stoffe noch keine Daten vorliegen, so hoch gewählt, daß eine anodische Wanderung erwartet werden darf. Die meisten Proteine und auch ihre Verbindungen mit anderen Stoffen zeigen innerhalb des pH-Bereiches von etwa 7-9 eine gute Löslichkeit und Stabilität, so daß sich dieser Bereich schon deshalb empfiehlt. Es ist aber, um Fehlschlüsse zu vermeiden, im allgemeinen unerläßlich, die bei solchen pH-Werten erhobenen Befunde unter Variation

der Wasserstoffionenkonzentration innerhalb des Stabilitätsbereiches des Untersuchungsmaterials zu sichern bzw. zu ergänzen. Nur auf diese Weise kann die elektrophoretische Einheitlichkeit von im Bilde aufgezeichneten Stoffen sichergestellt oder ihre Uneinheitlichkeit bewiesen werden. Zum Beispiel lassen sich die beiden Albumine  $A_1$  und  $A_2$  des humanen Plasmas bei einem pH-Wert von 8-9 nicht ohne weiteres trennen, während sie bei einem solchen von 4-5 leicht unterschieden werden können<sup>45</sup>.

Aus den gleichen Gründen, die eine möglichst niedrige Proteinkonzentration als ratsam erscheinen lassen, ist die Ionenstärke  $\mu$  der verwendeten Pufferlösungen relativ hoch zu wählen<sup>46</sup>. Werte von  $\mu = 0,1$

<sup>45</sup> J. A. LOEFSCHER jr., Amer. Chem. Soc. 61, 2888 (1939); vgl. auch H. HOCH und C. J. O. R. MORRIS, Nature 156, 234 (1945).

<sup>46</sup> G. E. PERLMANN und D. KAUFMAN, Amer. Chem. Soc. 67, 638 (1945).

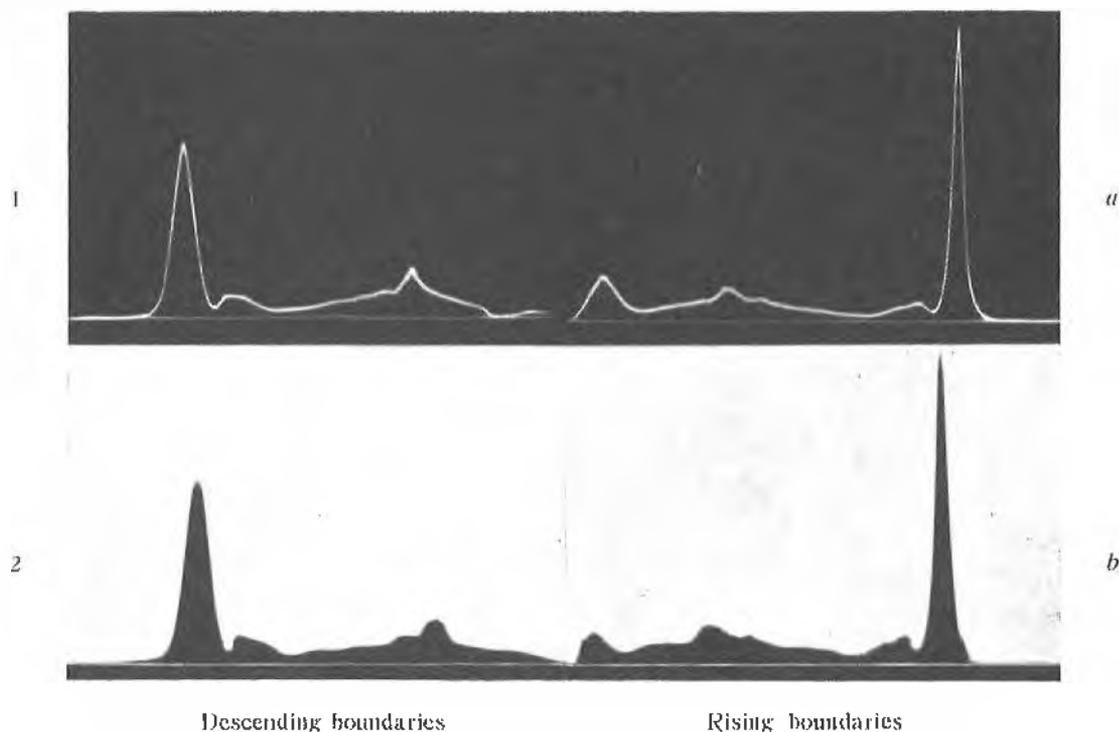


Abb. 6b. Elektrophorese-Diagramme zweier normaler Elefanten-Plasmen

1 Elefant Menta (Circus Knie); a Diagramm nach SVENSSON

2 Elefant Frieda (Circus Knie); b Diagramm nach PHILPOT

Kleinbild-Aufnahmen

bis 0,2 sind üblich; noch höhere Ionenstärken bedingen unverhältnismäßig lange Versuchszeiten, da dann der Anteil der Proteine am Stromtransport relativ klein wird. Damit verschlechtern sich die Voraussetzungen für die Erzielung scharfer Diagramme wieder.

Schärfe und Fehlerfreiheit der Bilder ist zu einem nicht unerheblichen Grade auch von den Eigenschaften der Ionen des Milieus, insbesondere von deren Beweglichkeiten, abhängig, wie dies in den Arbeiten von V. P. DOLE<sup>47</sup> und H. SVENSSON<sup>48</sup> gezeigt und begründet worden ist. Eine daraus hergeleitete Regel besagt, daß die Ionenbeweglichkeiten der als Puffer verwendeten Salze möglichst klein zu wählen sind und daß im besonderen bei anodischer Wanderungsrichtung der Proteinionen die Anionen des Puffers, bei kathodischer Richtung seine Kationen langsam sein sollen. Aus diesem Grunde verwendet man als Puffer bei Elektrophoreseversuchen im allgemeinen nicht die üblichen Mischungen niedrigmolekularer Salzlösungen, wie sie von S. P. L. SÖRENSEN eingeführt wurden, sondern vorzugsweise Veronal-Puffergemische mehr oder weniger komplizierter Zusammensetzung<sup>49, 50</sup>.

Ein unter Beachtung dieser Richtlinien ausgeführter Elektrophoreseversuch wird, sofern auch die Extragradien eliminiert wurden, zu einem Bilde führen, wie es in der Abb. 5 a wiedergegeben ist. Darin sind die Kurvenzüge der absteigenden Grenzflächen wiedergegeben. Obwohl die beiden Teilbilder der auf- und absteigenden Gradienten nicht spiegelbildlich zueinander sind, ergeben sie dann doch in bezug auf die korrespondierenden Kurvenzüge praktisch gleiche Beweglichkeitswerte und sehr gut übereinstimmende Flächenwerte<sup>51</sup>, da bei deren Bestimmung der Habitus der Kurvenzüge keine Rolle spielt. Ihre etwas verschiedene Steilheit (Schärfe) ist in erster Linie eine Folge des unvermeidlichen kleinen Feldstärke-Unterschieds zu beiden Seiten eines jeden Gradienten, der sich in den beiden U-Rohrschenkeln entgegengesetzt auswirkt, indem er bei den absteigenden Gradienten den Effekt der Diffusion verstärkt, bei den aufsteigenden dagegen schwächt<sup>52</sup>. Die daraus herleitbare Kompensation des Diffusions-effekts hat sich in speziellen Fällen experimentell bestätigen lassen<sup>53</sup>, ist aber zunächst ohne praktische Bedeutung geblieben. Dagegen ist die Gleichwertigkeit der beiden Teilbilder in bezug auf die Beweg-

<sup>47</sup> V. P. DOLE, Amer. Chem. Soc. 67, 1119 (1945).<sup>48</sup> H. SVENSSON, Ark. Kem. Mineral. Geol. 22, A, 10, 1 (1946).<sup>49</sup> L. G. LONGSWORTH, Chem. Rev. 30, 323 (1942).<sup>50</sup> E. WIEDEMANN, Schweiz. med. Wschr. 76, 241 (1946).<sup>51</sup> Vgl. E. WIEDEMANN, Helv. Chim. Acta 30, 168 (1947).<sup>52</sup> L. G. LONGSWORTH und D. A. MCINNIS, Amer. Chem. Soc. 62, 705 (1940).<sup>53</sup> L. G. LONGSWORTH, Amer. Chem. Soc. 67, 1109 (1945).

lichkeits- und Flächenwerte für die Elektrophoresetechnik wichtig, weil sie erlaubt, die bisher wohlbegründete<sup>54</sup> und deshalb übliche Auswertung des Bildes der absteigenden Gradienten durch jene des störungsfreieren<sup>55</sup> Bildes der aufsteigenden Gradienten zu ersetzen.

Da das Bild der aufsteigenden Gradienten zudem im allgemeinen schärfer ist und bleibt, kann bei ihm der Vorteil dreiteiliger, hoher analytischer Zellen (vgl. Abb. 2), nämlich die Vergrößerung der Weglänge  $s$  von 40 auf 86 mm und damit die Verdoppelung des Auflösungsvermögens, besonders gut ausgenutzt werden. Dies sei durch Abb. 6a und b (Seiten 32/33) illustriert, deren Diagramme erheblich mehr Details aufweisen, als sie die mit der vierteiligen Standard-Zelle aufgenommene Abb. 5a erkennen läßt. Aus Abb. 6 ist zugleich ersichtlich, daß eine Steigerung des Auflösungsvermögens die Schwierigkeiten bei der Extrapolation der Kurvenzüge vermindern kann. Eine gute Auflösung im Bilde wird auch durch sehr scharfe Anfangsgradienten begünstigt. Um diese zu erhalten, ist es nicht nur nötig, die Zelle vorsichtig zu öffnen, sondern auch die Zellen, Elek-

trodengefäße und Zellenhalter auf  $+ 2^{\circ}$  vorzukühlen, den Versuch bei dieser Temperatur anzusetzen und dafür zu sorgen, daß eine Erwärmung des beschickten Zellsatzes beim Übertragen in den Thermostaten vermieden bleibt. Vergleichende Versuche haben ergeben, daß diese Arbeitsweise das Auflösungsvermögen weiter erheblich steigern kann<sup>56</sup>.

Den vorstehenden Ausführungen entsprechend ist die Elektrophorese im Prinzip eine *analytische Methode*, deren Wert und Bedeutung durch eine bereits sehr große Zahl von Untersuchungen belegt wird. Als solche seien genannt:

In der Medizin: Messungen bzw. Analysen von proteinhaltigen Körperflüssigkeiten, wie Serum und Plasma<sup>57, 58</sup>, serösen Ergüssen und pathologischen Harnen<sup>59</sup>, Cerebrospinal- und Augenkammerflüssigkeit<sup>60, 61</sup>; von Hormonen<sup>62, 63</sup>; von Muskelhydrolysaten<sup>64</sup>;

in der Immunologie: Untersuchungen an Immunsereen und Antitoxinen<sup>65, 66</sup>;

in der Bakteriologie: Studien an verschiedenen Bakterien<sup>67, 68</sup> und Virus-Arten<sup>69</sup> sowie Allergenen<sup>70</sup>;

<sup>54</sup> Vgl. z. B.: E. WIEDEMANN, Schweiz. med. Wschr. 75, 229 (1945).

<sup>55</sup> Das Bild der aufsteigenden Gradienten ist im Falle von Plasmaanalysen frei von der sog. « $\beta$ -Globulin disturbance», vgl. D. H. MOORE und J. LYNN, J. Biol. Chem. 141, 819 (1941), und die Ausführungen S. 186 in: ABRAMSON, MOYER und GORIN, Electrophoresis of Proteins, Reinhold Publ. Corp., New York 1942.

<sup>56</sup> Unveröffentlicht.

<sup>57</sup> L. G. LONGSWORTH, TH. SHEDLOVSKY und D. A. MC INNES, J. Exper. Med. 70, 399 (1939); L. G. LONGSWORTH und D. A. MC INNES, J. Exper. Med. 71, 77 (1940); J. A. LUETSCHER jr., J. Clin. Invest. 19, 313 (1940); 20, 99 (1941); A. B. GUTMAN, D. H. MOORE, E. B. GUTMAN, V. MCCLELLAN und E. A. KABAT, J. Clin. Invest. 20, 765 (1941); R. A. KERWICK, Biochem. J. 33, 1122 (1939); 34, 1248 (1940); G. BLIX, Z. ges. exper. Med. 105, 595 (1939); G. BLIX, A. TISELIUS und H. SVENSSON, J. Biol. Chem. 134, 485 (1941), und zahlreiche weitere Veröffentlichungen.

<sup>58</sup> In der Schweiz: E. WIEDEMANN, Schweiz. med. Wschr. 74, 566 (1944); 75, 229 (1945); 76, 241 (1946), und weitere Veröffentlichungen.

<sup>59</sup> J. A. LUETSCHER jr., Amer. Chem. Soc. 61, 2888 (1939); J. Clin. Invest. 19, 313 (1940); 20, 99 (1941); 23, 465 (1944).

<sup>60</sup> L. HESSELVIK, Skand. Arch. Physiol. 82, 151 (1939); Acta Med. Scand. 101, 461 (1939); E. A. KABAT, H. LANDOW und D. H. MOORE, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 49, 260 (1942).

<sup>61</sup> G. VIOLLIER, H. LABHART und H. SÜLLMANN, Helv. Physiol. Pharm. Acta 5, C, 10 (1947).

<sup>62</sup> R. A. SHIPLEY, K. G. STERN und A. WHITE, J. Exper. Med. 69, 785 (1939); C. H. LI, W. R. LYONS und H. M. EVANS, Amer. Chem. Soc. 62, 2925 (1940); 63, 43 (1941).

<sup>63</sup> M. HEIDELBERGER und KAT O. PEDERSEN, J. Gen. Physiol. 19, 95 (1935); C. H. LI, M. E. SIMPSON und H. M. EVANS, Science 92, 355 (1940); C. H. LI, H. M. EVANS und D. H. WONDER, J. Gen. Physiol. 23, 733 (1940); S. GURIN, C. BACH-

MAN und D. W. WILSON, Amer. Chem. Soc. 61, 2251 (1939); J. Biol. Chem. 133, 467 (1940); M. COHN, G. W. IRVING und V. DU VIGNEAUD, J. Biol. Chem. 137, 635 (1941), und weitere Veröffentlichungen.

<sup>64</sup> E. C. BATE-SMITH, Biochem. J. 34, 1122 (1940); M. DUBOUSSON und J. JACOB, Experientia 1, 273 (1945); J. JACOB, Experientia 2, 110 (1946).

<sup>65</sup> A. TISELIUS und E. A. KABAT, J. Exper. Med. 69, 119 (1939); D. H. MOORE, J. VAN DER SCHEER und R. W. G. WYCKOFF, J. Immunol. 38, 221 (1940); J. VAN DER SCHEER und R. W. G. WYCKOFF, Science 91, 485 (1940); J. VAN DER SCHEER, R. W. G. WYCKOFF und F. H. CLARKE, J. Immunol. 39, 65 (1940); 40, 39 (1941); 40, 173 (1941), und weitere Veröffentlichungen.

<sup>66</sup> J. VAN DER SCHEER und R. W. G. WYCKOFF, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 45, 634 (1940); A. M. PAPPENHEIMER jr., H. P. LUNDGREN und J. W. WILLIAMS, J. Exper. Med. 71, 247 (1940).

<sup>67</sup> L. S. MOYER, J. Bacteriol. 31, 531 (1936); 32, 433 (1936); T. W. STEARNS und M. H. ROEPKE, J. Bacteriol. 42, 411 (1941); 42, 745 (1941).

<sup>68</sup> F. B. SEIBERT, K. O. PEDERSEN und A. TISELIUS, J. Exper. Med. 68, 413 (1938); M. G. SEVAG, J. SMOLENS und K. G. STERN, J. Biol. Chem. 139, 925 (1941).

<sup>69</sup> M. A. LAUFFER und W. M. STANLEY, Koll.-Z. 91, 62 (1940); M. A. LAUFFER und A. F. ROSS, Amer. Chem. Soc. 62, 3296 (1940); A. S. McFARLANE und R. A. KERWICK, Biochem. J. 32, 1607 (1938); G. MELCHERS, G. SCHRAMM, A. TURMIT und FRIEDRICH-FRESKA, Biol. Zbl. 60, 524 (1940); H. NEURATH, G. R. COOPER, D. G. SHARP, A. R. TAYLOR, D. BEARD und J. W. BEARD, J. Biol. Chem. 140, 293 (1941); J. BOURDILLON und E. H. LENNETTE, J. Exper. Med. 72, 11 (1940); W. M. STANLEY und M. A. LAUFFER, J. Physic. Coll. Chem. 51, 148 (1947).

<sup>70</sup> H. A. ABRAMSON, D. H. MOORE, H. GETTNER, J. GAGARIN und L. JENNINGS, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 44, 311 (1940); H. A. ABRAMSON, D. H. MOORE und H. GETTNER, J. Physic. Chem. 46, 192 (1942).

in der Enzymologie: Messungen an den verschiedensten Enzymen bzw. Fermenten und Chromoproteiden<sup>71, 72, 73</sup>;

in der Nahrungsmittelchemie: Untersuchungen an Hühnereiweiß<sup>74</sup>, Milch<sup>75</sup> und deren Proteinen<sup>76</sup>; an Getreideproteinen<sup>77</sup> usw.;

in der technischen Chemie: Untersuchungen an Wolle und Seide<sup>78</sup>, Gelatine<sup>79</sup>, Pektinen<sup>80</sup> und besonders an Latex-Arten<sup>81</sup>.

In vielen Fällen hat die Elektrophorese als Test- und Kontrollmethode bei der Ausarbeitung von Darstellungsverfahren für pharmazeutisch oder technisch wichtige Proteine hervorragende Dienste leisten können, so z. B. bei der Trennung und Isolierung der Plasmaproteine in großem Maßstab<sup>82</sup>.

Die Bedeutung der Elektrophorese als präparative Methode<sup>83</sup> tritt dagegen zurück; sie ist vorläufig beschränkt auf die Darstellung kleiner Mengen reiner Präparate. Der Grund dafür ist, daß elektrophoretische Trennungen im allgemeinen nicht quantitativ durchzuführen sind, eine erhebliche Verlängerung der Versuchsdauer meistens Komplikationen im Gefolge hat und die Stabilität von Grenzflächen, die an sich klein ist, mit deren Vergrößerung weiter abnimmt. Modifikationen der Methodik, die vereinfachen<sup>84</sup>, scheinen mit Nachteilen verbunden

zu sein. Gefänge es, die Schwierigkeiten zu überwinden, die einer Übertragung der heute üblichen analytischen Elektrophoresemethodik auf größere Maßstäbe entgegenstehen, so würde die Elektrophorese zweifelsohne in der chemischen Technik eine erhebliche Bedeutung erlangen.

Mit diesen wenigen Angaben war aufzuzeigen, in welchem Rahmen und Umfange sich die Elektrophorese als wertvoll erweisen kann. Der erhebliche Beitrag, den die Elektrophorese bei der Erschließung des Proteingebietes leistet, spiegelt sich recht augenfällig in der neueren Literatur, worin außer den erwähnten noch zahlreiche andere Anwendungen beschrieben sind.

Immer, wenn es sich darum handelt, die Zusammensetzung von Proteingemischen, die Wirksamkeit einer Fraktionierung, den Reinheitsgrad isolierter Fraktionen oder die Eigenschaften von Proteinen im elektrischen Feld zu bestimmen, wird die Elektrophorese, wie sie von A. TISELIUS eingeführt und von L. G. LONGSWORTH, H. SVENSSON und anderen Forschern zu großer Vollkommenheit gebracht wurde, eine der zu wählenden Methoden sein. Die Möglichkeit, einen Beitrag an die Entwicklung dieser Methode leisten zu dürfen, verdankt der Verfasser der großzügigen Unterstützung von Herrn Prof. A. STOLL herzlich.

<sup>71</sup> A. TISELIUS, G. E. HENSCHEN und H. SVENSSON, *Biochem. J.* **32**, 1814 (1938); R. M. HERRIOT, V. DESREUX und H. J. NORTHROP, *J. Gen. Physiol.* **23**, 439 (1940); H. THEORELL, *Naturwiss.* **22**, 289 (1934); *Biochem. Z.* **278**, 263 (1935); *Naturwiss.* **22**, 290 (1934); *Biochem. Z.* **275**, 11 (1934); **279**, 463 (1935); *Ergebn. Enzymforsch.* **6**, 111 (1937); K. H. MEYER, ED. H. FISCHER und P. BERNFELD, *Helv. Chim. Acta* **30**, 64 (1947); T. L. McMEKIN, *J. Biol. Chem.* **128**, 56 (1939).

<sup>72</sup> B. VAHLQUIST, *Skand. Arch. Physiol.* **72**, 133 (1935); A. ROTHEN, *J. Gen. Physiol.* **24**, 203 (1940); E. C. BATE-SMITH, *Biochem. J.* **34**, 1122 (1940); J. L. MELNIK und K. G. STERN, *Enzymologia* **8**, 129 (1940); F. WERLE und J. DAUMER, *Biochem. Z.* **304**, 377 (1940).

<sup>73</sup> A. STOLL, E. WIEDEMANN und A. RÜEGGER, *Verh. Schweiz. naturf. Ges.* **1941**, S. 125; M. FISHMAN und L. S. MOYER, *Science* **95**, 128 (1942); L. EMDEN, *Helv. Chim. Acta* **30**, 15 (1947).

<sup>74</sup> K. LANDSTEINER, L. G. LONGSWORTH und J. VAN DER SCHEER, *Science* **88**, 83 (1938); A. TISELIUS und I.-B. ERIKSSON-QUENSEL, *Biochem. J.* **33**, 1752 (1939); L. G. LONGSWORTH, *Amer. Chem. Soc.* **61**, 529 (1939); L. G. LONGSWORTH, R. K. CANNAN und D. A. McINNES, *Amer. Chem. Soc.* **62**, 2580 (1940); A. TISELIUS und H. SVENSSON, *Trans. Faraday Soc.* **225**, 16 (1940).

<sup>75</sup> L. S. MOYER und E. Z. MOYER, *J. Biol. Chem.* **132**, 357 (1940); L. S. MOYER, *J. Biol. Chem.* **133**, 29 (1940).

<sup>76</sup> R. C. WARNER, *Amer. Chem. Soc.* **66**, 1725 (1944); O. MELLANDER, *Nature* **155**, 604 (1945); Hs. NITSCHMANN und W. LEHMANN, *Experientia* **3**, 153 (1947).

<sup>77</sup> O. QUENSEL, Untersuchungen über die Gerstenglobuline, S. 59, Diss. Uppsala 1942.

<sup>78</sup> A. M. SOOKNE und M. HARRIS, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **23**, 471 (1939); **23**, 299 (1939).

<sup>79</sup> J. BEEK jr. und A. M. SOOKNE, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **23**, 271 (1939); L. S. MOYER und E. Z. MOYER, *J. Biol. Chem.* **132**, 357 (1940).

<sup>80</sup> R. SPENNER, M. J. COPLEY und G. C. NUTTINO, *J. Physic. Coll. Chem.* **51**, 117 (1947).

<sup>81</sup> E. A. HAUSER und M. BENDER, *Proc. Rubber Technol. Conf., London 1938*; C. BONDY, *Trans. Faraday Soc.* **35**, 1093 (1939); L. S. MOYER, *Trans. Faraday Soc.* **36**, 248 (1940).

<sup>82</sup> E. J. COHN, T. L. McMEKIN, J. L. ONCLEY, J. M. NEWELL und W. L. HUGHES, *Amer. Chem. Soc.* **62**, 3386 (1940); E. J. COHN, J. A. LUETSCHER jr., J. L. ONCLEY, S. H. ARMSTRONG und D. B. DAVIS, *Amer. Chem. Soc.* **62**, 3396 (1940); J. W. WILLIAMS, M. L. PETERMANN, G. C. COLOVOS, M. B. GOODLOE, J. L. ONCLEY und S. H. ARMSTRONG jr., *J. Clin. Invest.* **23**, 433 (1944); vgl. auch: J. L. ONCLEY, G. SCATCHARD und A. BROWN, *J. Physic. Coll. Chem.* **51**, 184 (1947).

<sup>83</sup> Die Konstruktion und Anwendung von größeren Elektrophoresezellen für präparative Zwecke im Laboratoriumsmaßstab ist beschrieben in: H. THEORELL, in *Biochem. Z.* **278**, 291 (1935); A. TISELIUS, *Koll.-Z.* **85**, 129 (1938); G. BLIX, A. TISELIUS und H. SVENSSON, *J. Biol. Chem.* **137**, 485 (1941); M. A. MACHEBOEF, *C. R. Soc. Biol.* **135**, 1241 (1941); H. SVENSSON, *Ark. Kem. Mineral. Geol.* **15**, B, 1 (1942); H. SVENSSON, *Ark. Kem. Mineral. Geol.* **22**, A, 1 (1946).

<sup>84</sup> Vgl. z. B.: H. THEORELL, *ABDERHALDENS Handb. biol. Arbeitsmethoden* V, Teil 10, 1097 (1936); M. COHN, G. W. IRVING und V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.* **137**, 675 (1941); L. HAHN und A. TISELIUS, *Biochem. Z.* **314**, 336 (1943).