Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 306—310, Mai 1970

Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Objektträgern

*Eine modifizierte Mikromethode der horizontalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese
für Routineuntersuchungen in der klinischen Chemie*

Von HILDE GÖTZ, F. SCHEIFFARTH und M. EBERL

*Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. Scheiffarth)*

(Eingegangen am 6. Januar 1970)

Es werden eine Methode der horizontalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Objektträgern beschrieben und die damit erzielten Befunde dargelegt. Die Mikro-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Objektträgern stellt eine für besondere Fragestellungen wichtige Zusatzmethode von bisher bekannten einfachen Trennverfahren von Proteingemischen dar. Das wird damit begründet, daß diese Technik einerseits eine bessere Differenzierung von Proteingemischen als herkömmliche einfache Elektrophoresemethoden gestattet, andererseits aber eine wesentliche Verkürzung der Analysendauer und außerdem einen entscheidend geringeren materiellen Aufwand als die Makromethode der horizontalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit sich bringt. Nicht unwichtig ist schließlich die Tatsache, daß die beschriebene Mikrotechnik keine Neuanschaffung einer speziellen Elektrophorese-Ausrüstung notwendig macht. In der Diskussion wird diese Methode mit der herkömmlichen Makromethode der horizontalen Polyacrylamidgel-Elektrophorese sowie mit der vertikalen Disk-Elektrophorese verglichen.

Polyacrylamide gel electrophoresis on microscope slides

A modified micromethod of horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for routine clinical studies

A method is described for horizontal polyacrylamide gel electrophoresis on microscope slides, and the results obtained are presented. In conjunction with other simple separation methods for protein mixtures, micropolyacrylamide gel electrophoresis is a useful auxiliary method for dealing with special problems. This method gives a better differentiation of protein mixtures than the original simple electrophoretic methods. Moreover, the analysis is essentially shorter and far less material is required than in the macro-method of horizontal polyacrylamide gel electrophoresis. It should also be noted that this microtechnique requires no new or specially made apparatus. The micro-method is compared with the original macro-method of horizontal polyacrylamide gel electrophoresis and with vertical disc electrophoresis.

Der Wunsch nach einer möglichst weitgehenden Differenzierung von Proteingemischen durch einfache Elektrophorese ist durch die Wahl des Stärkegels als Trägermedium im wesentlichen bereits erfüllt worden (1). RAYMOND und WEINTRAUB (2) berichteten 1959 über die Anwendbarkeit eines synthetischen Gels, Polyacrylamidgel, als Medium für elektrophoretische Trennverfahren. Die Differenzierungsergebnisse dieses Gels sind mit denjenigen im Stärkegel vergleichbar, d. h. die Ergebnisse der einen wie der anderen Methode sind nahezu gleichartig. Dennoch erweist sich das Polyacrylamidgel dem Stärkegel insofern als überlegen, als es eine größere Thermostabilität hat, bessere Transparenz bietet und eine günstigere stoffliche Konsistenz aufweist. Darüber hinaus kann die molekulare Gitterdichte festgelegt werden.

Wenn sich die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese trotz dieser Vorzüge bislang im klinisch-chemischen Routine-laboratorium noch nicht durchgesetzt hat, dann sind hierfür zwei wesentliche Gründe zu nennen: Erstens zeichnen sich aufgrund der erwähnten besseren Differenzierung von Proteingemischen im Polyacrylamid-Gel bei Trennung etwa eines Serums wesentlich mehr Fraktionen ab als bei Elektrophorese auf Papier, Celluloseacetatfolien oder auch im Agargel, eine Feststellung, die zwar wünschenswert erscheint, die es aber mit sich bringt, eine neue Zuordnung bisher bekannter Fraktio-

nen zu den erzielten Proteinmustern vorzunehmen. Die hierzu erforderlichen biochemischen Analysen sind jedoch bis heute noch nicht abgeschlossen, so daß zunächst noch mit einer Reihe unbekannter Faktoren gerechnet werden muß. Zweitens erfordert die bisherige Technik der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese auf planen Platten (2, 3, 4, 5, in 6, 7, in 8, 9, 10, 11 a, b, c) sowohl einen großen Aufwand an Reagenzien und Zeit, allein für die Aufbereitung des Polyacrylamid-Gels, als auch eine lange Trennzeit (8 bis 14 Stdn.), die wiederum die Methode als eine Routinemethode ausscheiden lassen.

Es war naheliegend, eine Technik zu entwickeln, die zumindest den Arbeits- und Zeitaufwand schmälern konnte; dies gelang mit der Disc-Elektrophorese in vertikalen Röhrchen (in 6, in 8, in 9). Jedoch setzt diese Elektrophoresemethode eine spezielle apparative Grund-ausrüstung voraus. Dies bezieht sich sowohl auf die völlig andersartige Anordnung der Trennbehälter, Polyacrylamid-Gel-Röhrchen, einen Kühlmantel und Spannungsspeisegerät zum Abgreifen von Hochspannungen. Demgegenüber kann die horizontale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in jeder üblichen Elektrophoresekammer und mit Spannungsspeisegeräten bis zu 400 V Gleichspannung vorgenommen werden. Eine Acrylamid-Mikromethode wurde bereits 1964 von KEUTEL und Mitarbeitern (12) sowie 1968 von VAN

ORDEN (13) mitgeteilt; die Versuchsanordnung war in beiden Fällen jedoch auf die Kombination mit Antiserumapplikation, d. h. auf eine Polyacrylamid-Gel-Immunoelktrophoresetechnik, abgestimmt. BREL und ZWISLER (4, 5, 11) berichteten im Rahmen ihrer Grundlagenstudien zur Technik der horizontalen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ebenfalls über die Möglichkeit der Trennzeitverkürzung. Erst 1968 haben ALLRED und KEUTEL (14) über eine Microslide-Acrylamidgel-Elektrophorese zur einfachen Differenzierung von Proteingemischen, hier von Organproteinen zum Isoenzymnachweis der Lactatdehydrogenase, berichtet.

Unabhängig hiervon wurde im Verlauf dieses Jahres im eigenen Arbeitskreis ebenfalls eine Mikro-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-Technik entwickelt, deren detaillierte Arbeitsvorschrift im folgenden mitgeteilt werden soll.

Methodik

Apparative Einrichtung, Material und Reagenzien

Apparative Einrichtung

- Spannungsspeisegerät (bis zu 400 V Gleichstrom)
- Elektrophoresekammer (z. B. Elektrophoresekammer für Immunoelktrophoresen der Fa. Dr. Bender & Dr. Hobein, München)
- Extinktionsschreiber (z. B. der Fa. Zeiss, Oberkochen)
- Photoeinrichtung zur Dokumentation der Trennergebnisse (entweder im durchscheinenden Licht oder im Kontaktverfahren mit Auflicht und unterlegtem, lichtempfindlichem Photopapier).

Material

- Objektträger
- Rasierklängen oder Skalpellen
- Weithals-Erlenmeyerkolben, etwa 250 ml fassend
- Meßpipetten à 5 ml
- Küvetten zum Färben und Entfärben der im Polyacrylamid-Gel gewanderten und differenzierten Proteinfractionen. (Bewährt hat sich hierfür eine im eigenen Laboratorium angefertigte Mehrzweck-Küvette (15), die vor allem ein Abschwimmen des Polyacrylamid-Gels von den Objektträgern verhindert)
- Filtrierpapier
- PVC-Folie (etwa 30 × 30 cm) für mehrere Ansätze.

Reagenzien

a) Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	} z. B. der Fa. Serva oder Merck
b) Citronensäure	
c) Borsäure	
d) Natriumhydroxyd-Plätzchen	
e) Cyanogum 41	
f) Kaliumpersulfat	} z. B. Behringwerke
g) Dimethylaminopropionitril	
h) Agar-Agar (purum)	
i) Merfen 4 promill.	
k) Amidoschwarz 10 B	
l) Eisessig (98proz.), etwa 2 l	} z. B. Merck
m) Natriumacetat · 3 H ₂ O	
n) Methanol, etwa 3 l	
o) dest. Wasser	

Arbeitsvorgänge

Die beste Auftrennung von Humanserumproteinen gelingt durch ein sogenanntes diskontinuierliches Puffersystem, d. h. durch Verwendung verschiedener Pufferlösungen, einer für das Polyacrylamid-Gel und einer anderen für die Puffertröge der Elektrophoresekammer. Als Gelpuffer wird ein Tris-Borat-Puffer gewählt, als Elektrophoresepuffer ein Boratpuffer.

Als Ausgangsstoff für die Gelgewinnung wird Cyanogum 41 verwendet, das durch Versetzen mit Katalysatoren gelige Beschaffenheit annimmt.

Herstellung des Elektrophorese-Puffers Boratpuffer pH 8,5

50,7 g Borsäure (1,094 Mol) und 10,9 g Natriumhydroxyd-Plätzchen (1,094 Mol) werden in Festform abgewogen und in einem Mischkolben ad 1000 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Dieser Puffer wird mit dest. Wasser im Verhältnis 1:2 verdünnt und gleichmäßig auf die Puffertröge der Elektrophoresekammer verteilt.

Herstellung des Polyacrylamidgels

a) Herstellung einer Tris-Borat-Stammlösung

Sie besteht aus einem Tris-Citronensäure-Puffer und einem Borsäure-Natronlauge-Puffer.

Tris-Citronensäure-Puffer

In einem Mischkolben zu 1000 ml wird eine 2,54M Tris-Lösung hergestellt. Hierzu werden 307,7 g abgewogen, in etwa 500 ml dest. Wasser gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. In einem weiteren Kolben mit geringerem Fassungsvermögen wird eine 2,54M Citronensäure-Lösung hergestellt. Hierzu werden 66,7 g Citronensäure abgewogen und ad 125 ml dest. Wasser aufgefüllt. 515 ml der Tris-Lösung und 60 ml der Citronensäure-Lösung werden nunmehr gemischt. Diese Mischung entspricht dem Tris-Citronensäure-Puffer.

Borat-Puffer pH 8,5

Dieser Puffer entspricht dem Elektrophorese-Puffer (S. 308).

Tris-Borat-Stammlösung

Mischen von 12,2 ml Tris-Puffer und 5 ml Boratpuffer bzw. ein Vielfaches von diesen, ergibt 17,2 ml bzw. ein entsprechendes Vielfaches der Stammlösung.

b) Versetzen der Stammlösung mit Cyanogum

Es werden 33 g Cyanogum 41 abgewogen und nach Zusatz von 17,2 ml Tris-Borat-Stammlösung auf 500 ml mit dest. Wasser aufgefüllt, wodurch eine 6,6proz. Cyanogumlösung gegeben ist. Vorbereitet werden schließlich eine 0,66proz. Kaliumpersulfatlösung in dest. Wasser sowie eine unverd. Dimethylaminopropionitril-Lösung.

c) Herstellung des kompletten Polyacrylamidgels

Dieser letzte Vorgang darf erst nach Vorbereitung der Objektträger (s. u.) erfolgen, da sofort Polymerisation in Gang kommt. Von der gepufferten Cyanogum-Lösung werden 30 ml abpipettiert und zum Zweck der Vernetzung mit 3 ml einer 0,66proz. Kaliumpersulfatlösung und 3,3 ml der Dimethylaminopropionitril-Lösung versetzt. Dabei wird so vorgegangen, daß zuerst die Kaliumpersulfatlösung, dann die Dimethylaminopropionitril-Lösung — beide unter Rühren — zugegeben werden. Die mit den Katalysatoren versetzte, gepufferte Cyanogum-Lösung muß nunmehr unverzüglich auf die Objektträger aufgebracht werden.

Herstellung des Objektträger-Polyacrylamid-Gel-Präparates

a) Vorbereitung der Objektträger

Die Objektträger werden mit 70proz. Alkohol entfettet und getrocknet. Für die Auftragestelle der zu untersuchenden Eiweiß-

Abb. 1

Schema zur Versuchsanordnung der Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Objektträgern. Darstellung eines Objektträgers in Originalgröße mit aufgelegtem Agarstreifen am Ort der späteren Auftragsstelle.

Oben: Aufsicht, daneben seitliche Ansicht

Unten: Originalstreifen einer im Polyacrylamid-Gel auf Objektträger getrennten Serumprobe

proben wird ein Agarstreifen mit den Abmessungen $10 \times 1,5 \times 1,5$ mm, etwa 5 mm von dem Objektträgerende entfernt, an dem später die Kathode angelegt werden soll, parallel zur Schmalseite des Objektträgers aufgelegt.

b) Herstellung des Agarstreifens

0,75 g eines Agars in Pulverform werden in einem Weithals-Erlenmeyerkolben mit 50 ml des Tris-Borat-Puffers pH 8,5 über der Bunsenflamme auf Asbest verflüssigt, eben zum Kochen gebracht (Vorsicht Siedeverzug!) und mit 0,2 ml einer 4 promill. Merfen-Lösung versetzt. 2,5 ml hiervon werden auf einem vorher entfetteten Objektträger gleichmäßig verteilt. Nach wenigen Minuten ist der Agar erstarrt. Aus ihm kann nun der oben angegebene Streifen für die Auftragsstelle herausgehoben werden (mit Rasierklinge oder Skalpell und einer Injektionsnadel (vgl. Abb. 1).

c) Beschicken der Objektträger mit Polyacrylamid-Gel

Jeder vorbereitete Objektträger wird mit 2,5 ml der unter Abschnitt c) (S. 307) komplettierten Cyanogum-Lösung beschickt. Dabei wird eine Meßpipette (5 ml) so gehalten, daß der Flüssigkeitsstrahl senkrecht auf den Objektträger auftrifft, wodurch ein Überfließen des Polyacrylamid-Gels über den Objektträgerrand verhindert wird und eine Schichtdicke von etwa 1,5 mm erzielt wird. Nach 20 bis 30 Min. ist das Gel erstarrt bzw. polymerisiert. Der vorher auf den Objektträger aufgebrachte Agarstreifen wird entfernt. Dazu wird der geringe Flüssigkeitsüberschuß, der auf dem erstarrten Gel zurückgeblieben ist, abgegossen oder abgesaugt, der Agarstreifen mittels einer Kanüle ohne Schwierigkeiten aus dem Polyacrylamid-Gel herausgehoben und die in der Auftragerinne verbliebene Flüssigkeit ebenfalls abgesaugt, damit das Untersuchungsmaterial ohne Verdünnungseffekt zur Auftragung gelangen kann.

Einlegen der Objektträger in die Elektrophoresekammer

Es werden Filtrierpapierstreifen vorbereitet, die in ihren Abmessungen mit denjenigen der Auftragerinne übereinstimmen. Diese Streifen werden in einfacher Lage mit den zu untersuchenden Proben getränkt und nach Abstreifen des Proteinüberschusses in die Auftragerinne eingelassen. Die Objektträger werden nunmehr, nachdem sie auf einer Elektrophoresebrücke aufgelegt waren, mit den Puffertrögen einer Elektrophoresekammer verbunden; dies geschieht durch Auflegen einer doppelten Lage Filtrierpapiers ($4 \times 2,5$ cm) an beiden Enden der Polyacrylamid-Gel-Objektträger-Präparate. Die Filtrierpapierstreifen sollten mit Elektrophorespuffer getränkt sein und etwa zu einem Drittel auf dem Polyacrylamid-Gel aufliegen und zu zwei Dritteln in den Puffertrögen beiderseits hängen. Eine Abdeckung mit PVC-Folie zum Schutz vor Austrocknung empfiehlt sich, ist aber wegen der Kürze der Elektrophoresedauer nicht unbedingt erforderlich; das gilt vor allem dann, wenn nur 1—3 Objektträger angeschlossen sind.

Elektrophorese-Bedingungen

Als Elektrophorese-Puffer dient Boratpuffer pH 8,5. Seine Zusammensetzung wurde auf S. 307 bereits beschrieben.

An den Elektroden der Elektrophoresekammer werden 200 V Gleichstrom angelegt. Die Trennzeit beträgt, in Abhängigkeit von der Zahl der in der Kammer befindlichen Objektträger, zwischen 45 und 120 Min. Die durchwandernde „Boratfront“ ist nach wenigen Min. an einer schmalbasigen, gelblich gefärbten Fraktion, die die gesamte Breite jedes Objektträgers einnimmt, erkennbar. Sie wandert etwa 1 cm der Albuminfraktion eines Humanserums voran. Die Elektrophorese ist beendet, wenn diese Boratfront den anodischen Rand der Objektträger erreicht hat.

Die Elektrophoresekammer wird nach jedem Analysengang umgepolt.

Färben und Entfärben der getrennten Proteinfraktionen

Zur Färbung von Proteinfraktionen erweist sich Amidoschwarz 10 B als am günstigsten.

a) Herstellung der Färbelösung

1 g Amidoschwarz 10 B wird in 1 l Acetat-Puffer gelöst.

Acetatpuffer Lösung I: 60 ml Eisessig (98proz.)
ad 1000 ml dest. Wasser auffüllen.

Lösung II: 13,6 g Natriumacetat $\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$
ad 1000 ml dest. Wasser auffüllen.

Lösung I und Lösung II werden zu gleichen Teilen, d. h. im Verhältnis 1:2 gemischt.

Um eine gute Färbung zu erzielen, werden die Objektträger-Präparate 2 Stdn. in der Färbelösung belassen.

Die Entfärbung erfolgt mit einem Entfärber, der aus dest. Wasser, Methanol und Eisessig im Verhältnis 5:5:1 (v/v) besteht. Um eine klare Differenzierung der Fraktionen zu erreichen, empfiehlt es sich, mindestens über eine Zeitdauer von 2 Stdn. unter mehrmaligem Wechseln des Entfärbers zu entfärben.

Dokumentation

Die so gefärbten Proteinfraktionen werden nunmehr mit einem Integrator ausgewertet. Die dabei gewonnenen Gradientenkurven können entweder semiquantitativ beurteilt oder durch Bestimmung der Flächeninhalte der einzelnen Gauss'schen Kurven in Relation zueinander gesetzt werden.

Darüber hinaus können die Proteinmuster photographisch oder durch Photokopie festgehalten werden.

Schließlich können die Objektträger mit dem Polyacrylamid-Gel bei 37° getrocknet, mit einem Acryl-Spray (Krylon) versehen und in einem Präparatekasten aufgehoben werden.

Zur

Analytica München

29. 4. — 2. 5. 70

in Halle 5

Stand 5216/5117

**Vertriebsgesellschaft
mbH. für Meßtechnik**

**75 Karlsruhe-Durlach
Bergwaldstraße 30**

Telefon (0721) 401011

Dünnschicht-Scanner II für H-3, C-14 und alle übrigen gebräuchlichen Radioisotope, durch auswechselbare Detektor- und Registriersysteme für alle Anforderungen der Dünnschichtchromatographie, der Papierchromatographie und des Kleintier-Scanning adaptierbar.

Zur ein- und zweidimensionalen Abtastung von Dünnschichtchromatogrammen und Elektropherogrammen mit Größen bis 200×400 mm. Eine Präzisions-Höhenverstellung des Detektors erlaubt optimale Annäherung an das Meßpräparat und daher höchste Zählausbeute und schärfste Trennung eng benachbarter Peaks. Die Vorschubgeschwindigkeiten sind in 9 Stufen zwischen 12 und 30000 mm/h wählbar. Auch schrittweiser Vorschub mit digitaler Datenausgabe ist möglich. Zweidimensional synchrone Registrierung mit dem Autochron-XY-Schreiber, lagen- und intensitätsrichtige zweidimensionale Darstellung von Radioaktivitätsverteilungen mit dem Punktdrucker.

Automatischer Probenwechsler FHT 770 D zur Bestimmung von Gamma-Aktivitäten in bis zu 120 handelsüblichen Reagenzgläsern nach DIN oder Zentrifugengläsern.

Das Gerät enthält außer der Wechselautomatik und einem bis zu $3'' \times 3''$ großen Szintillationsdetektor mit starker Abschirmung die gesamte volltransistorisierte Elektronik aus FHT-Einschüben.

Es wird jeweils ein Glas entnommen und nach der Messung auf seinen Platz zurückgestellt. Die Gesamtheit der Gläser wird nicht bewegt, die Geometrie nicht verändert. Auch bei Funktionsfehlern kein Glasbruch. Unbesetzte Plätze werden vom Greifer übergangen.

Der Meßvorgang kann zyklisch wiederholt oder nach einem bestimmten Glas automatisch beendet werden. Einzelmessung von Proben außerhalb des vorgegebenen Programmes ist möglich.

Datenausgabe über Digitaldrucker, elektronischen Tischrechner oder Streifenlocher.

Gebrauchsfertige Adsorbenzien Woelm zur Chromatographie sparen Zeit – lösen Probleme

Dünnschicht

DC-Fertigplatten Woelm Kieselgel
DC-Folien Woelm Kieselgel
DC-Fertigplatten Woelm
Kieselgel F 254/366
DC-Folien Woelm Kieselgel F 254/366

Alle Platten und Folien 20×20 cm
in Kartons zu 25 Stück

F 254/366 = Fluoreszenz-Indikator für
kurz- und langwelliges UV

Homogene Schicht -
Ausgezeichnete Trennung

Trocken-Säule

Aluminiumoxid Woelm für Trocken-
Säulen-Chromatographie,
Packung zu 5 kg

Kieselgel Woelm für Trocken-Säulen-
Chromatographie, Packung zu 3 kg

Trocken-Säulen-Aktivität

Beide Präparate mit Fluoreszenz-
Indikator für kurzwelliges UV

Die Trocken-Säulen-Chromatographie ist
eine neue Methode, dünn-schichtchro-
matographische Trennungen auf präpara-
tiven Maßstab zu übertragen

Mit Informationen stehen wir gern zur Verfügung

M. Woelm
D-344 Eschwege
Postfach 840

DR. MED. GESCHÄFTSFÜHRUNG SERVICE-LABORATORIUM BIOCHEMIE

Wir sind ein europäisches Großunternehmen der chemischen Industrie und haben, gemeinsam mit einem amerikanischen Partner, ein Dienstleistungslaboratorium mit Sitz in Südwestdeutschland gegründet, welches mit den modernsten technischen Einrichtungen ausgerüstet wird für die Durchführung von biochemischen, endokrinologischen, mikrobiologischen und toxikologischen Spezialuntersuchungen im Auftrage von Kliniken, praktizierenden Ärzten und Forschungsinstituten. Das Laboratorium wird die Möglichkeiten der medizinischen Diagnostik entscheidend verbessern und mit der computerisierten Auswertung komplexer Meßdatenspektren diagnostische Pionierarbeit leisten.

Das umfassende wissenschaftliche und technologische Know-how des bedeutendsten Unternehmens dieser Art in den USA (in welchem Sie sich übrigens vorbereiten werden), der finanzielle Rückhalt zweier bedeutender Industriekonzerne sowie der Nukleus des wissenschaftlich qualifizierten Mitarbeiterstabes sind das, was Sie vorfinden werden. Davon ausgehend werden Sie als Geschäftsführer sehr weitgehende unternehmerische Selbständigkeit haben. Es ist Ihre Aufgabe, das Dienstleistungsunternehmen zunächst in Deutschland, anschließend auf internationaler Ebene zu einem erstklassigen wissenschaftlichen Ruf zu führen.

Wenn Sie sich als Facharzt für innere Medizin oder Laboratoriumsdiagnostik für eine unternehmerische Aufgabe interessieren, möchten wir uns gerne mit Ihnen über unsere Zukunftspläne unterhalten. Der beauftragte Berater von Fry Consultants, Herr C. Lauterburg, steht Ihnen für ein erstes Orientierungsgespräch zur Verfügung. Er wird den Kontakt mit uns nur aufnehmen, wenn Sie uns persönlich kennenlernen möchten. Über Chiffre 121 KC 3-70 an Merkur Werbung, 521 Troisdorf-Spich, Hauptstraße 23-27 gelangt Ihre Anfrage direkt an uns.

FRY CONSULTANTS INC.,

Unternehmensberatungen
Abt. Personalberatung
Kraftstraße 29 CH-8044 Zürich
Telefon 328308

Abb. 2

Diagramm und Streifen eines im Polyacrylamid-Gel auf Objektträgern getrennten normalen menschlichen Serums. Auswertung erfolgte mit dem Zeiss-Extinktiometer 3 (für Celluloseacetatfolien und Objektträgerpräparate)

Abb. 3

Diagramme von zwei Beispielen einer Trennung von Seren im Polyacrylamid-Gel auf Objektträgern

Oben: Differenzierung von zwei Prä-Albuminfraktionen sowie von drei Postalbuminfraktionen (Fraktionen zwischen Albumin und Transferrin)

Unten: Deutliche Relationsverschiebung im Bereich der Postalbuminfraktionen

Ergebnisse

Mit der oben beschriebenen Methode einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese auf Objektträgern wird bei Analyse z. B. eines menschlichen Serums eine Differenzierung in bis zu 18 Proteinkomponenten möglich (Abb. 2 und 3). Die Fraktionen stellen sich scharf dar. Die Konstellation entspricht dem von der Mikro-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese her bekannten Proteinstreifenmuster. Die Auswertung in Form einer Gradientenkurve gelingt ohne Schwierigkeiten und einwandfrei.

Diskussion

Die vorliegenden technischen Angaben einer Mikro-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese auf Objektträgern und die damit erzielten ersten Befunde stellen eine für das klinisch-chemische Routinelaboratorium geeignete Methodik einer zusätzlichen Differenzierung von Proteingemischen und damit eine wahre Bereicherung dar. Im Vergleich zu einer Microslide-Acrylamidgel-Elektrophorese, wie sie von ALLRED und KEUTEL (14) mitgeteilt wurde, bringt die vorliegende eigene Methode, die im übrigen völlig unabhängig von dieser Unter-suchergruppe entwickelt wurde, keine nennenswerten Abweichungen.

Die Vorzüge der horizontalen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese auf Objektträgern sind folgendermaßen zu erläutern: Es wurde eingangs bereits darauf hingewiesen, daß die horizontale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in der bisherigen Technik bei Verwendung von Platten mit den Ausmaßen von 17 × 12 cm und größer, lange Trennzeiten, große Mengen an Polyacrylamid-Gel und auch relativ große Mengen an aufzutrennendem Material erfordert. Dies ist zwar bis zu einem gewissen Grad kompensierbar, jedoch werden diese Faktoren Gewicht erhalten, wenn es darum geht, zusätzliche Untersuchungen, etwa Fermentnachweisreaktionen oder Lipoprotein- oder Glykoprotein-Differenzierungen vorzunehmen. Der hierbei nötige Aufwand an Reagenzien würde von vornherein die Einführung der Makromethode in die Routine fragwürdig erscheinen lassen. In vielen Fällen der klinischen und vor allem der experimentellen Plasmaproteinforschung stehen grundsätzlich nur kleinste Mengen an Untersuchungsgut zur Verfügung, so daß eine Methode, wie sie vorliegend beschrieben wurde, solche Mikroquantitäten mit gleicher Präzision wie die Makro-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zu differenzieren vermag und damit einen echten Fortschritt darstellen dürfte. Dies gilt im übrigen auch für Fragestellungen im Rahmen mikrogeweblicher oder tierexperimenteller Untersuchungen, wie sie u. a. in der vergleichenden klinischen Chemie und bei Verlaufsforschungen Bedeutung erlangen.

Im Vergleich zur Disc-Elektrophorese in vertikalen Röhrchen, die im Prinzip eine Art Mikro-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese darstellt, bietet die plane Objektträgermethode den Vorteil, daß keine Neueinrichtung bzw. Neuausrüstung einer Elektrophoreseapparatur erforderlich wird. Wie ebenfalls bereits erwähnt, wird die

vertikale Disc-Elektrophorese in einer nur eigens hierfür konstruierten Apparatur mit eigenem Spannungsspeisegerät und Kühlung vorgenommen. Beabsichtigt man, ein größeres Untersuchungsprogramm nur mit Hilfe der Disc-Elektrophorese durchzuführen, so kann selbst-

verständlich die dafür erforderliche Grundausrüstung beschafft werden. Andere gängige Elektrophoresemethoden, etwa auf Celluloseacetatfolien, werden in diesem Fall dann aber nicht möglich sein.

Literatur

1. SMITHIES, O., *Biochem. J.* 61, 629 (1955) und *Biochem. J.* 71, 585 (1959). — 2. RAYMOND, S. und L. WEINTRAUB, *Science* (Washington) 130, 711 (1959). — 3. ANTOINE, B., *Science* (Washington) 138, 977 (1962). — 4. BIEL, H. und O. ZWISLER, *Behringwerkmitt.* 46, 141 (1966). — 5. BIEL, H., N. HEIMBURGER, D. KRAFT, TH. KRANZ und R. SCHMIDTBERGER, *Behringwerkmitt.* 43, 1 (1964). — 6. BLOEMENDAL, H., *Zone electrophoresis in blocks and columns*. Elsevier (Amsterdam) 1963. — 7. FERRIS, T. G., R. E. EASTERLING und R. E. BUDD, *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 8, 792 (1963). — 8. MAURER, R., *Disc-Elektrophorese*. Walter de Gruyter & Co., Berlin (1968). — 9. ORNSTEIN, L., *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 121, 321 (1964). — 10. RAYMOND, S., *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 121, 350 (1964). — 11. ZWISLER, O. und H. BIEL, *Behringwerkmitt.* 46, 129 (1966); *diese Z.* 4, 58 (1966) und *Proptides Biol. Fluids, Proc. 12th Coll. Brugge 1964*; H. Peeters edit. Elsevier, Amsterdam, (1965). — 12. KEUTEL, H. J., C. R. AMMONS, Jr. und W. H. BOYCE, *Invest. Urol.* 2, 22 (1964). — 13. VAN ORDEN, D. E., *Immunochemistry* 5, 497 (1968). — 14. ALLRED, R. J. and H. J. KEUTEL, *J. Laborat. Clin. Med., S. Louis* 71, 179 (1968). — 15. PÉREZ-MIRANDA, M. und H. Götz, *diese Z.* 6, 499 (1968).

Priv.-Doz. Dr. Hilde Götz
Prof. Dr. F. Scheiffarth
M. Eberl
8520 Erlangen
Krankenhausstr. 12