

Elektroforeza na papiru I.

Utjecaj vodljivosti pufera na stupanj rastavljanja komponenata smjese proteina

IVAN BERKEŠ i VINKA KARAS

Do sada su se za elektroforezu na papiru primjenjivale samo tri metode: Po Durrumu¹⁾, kod koje je papirna traka prebačena preko staklenog štapa i svojim krajevima umočena u elektrodne posude s puferom; po Cremeru i Tiseliusu²⁾, koji izvode elektroforezu na papiru među staklenim pločama uz hlađenje klorbenzenom i konačno elektroforeza u horizontalno slobodno obješenoj traki u vlažnoj komori, koja je najstarija, a potječe od Wielanda³⁾.

Način rada po Durrumu¹⁾ prihvatili su Flynn i de Mayo⁴⁾, koji su tu metodu dotjerali do vrlo točne kvantitativne kliničke metode. Metodu Cremera i Tiseliusa koriste Mills i Smith⁵⁾ za odvajanje enzima, a Schwarz⁶⁾ za određivanje pokretnosti i izoelektrične točke konjskog serum-albumina. Iako smo i mi⁷⁾,⁸⁾, prije radili na taj način, a i s nešto modificiranom aparaturom, mi smo ga iz više razloga napustili. Wieland je na horizontalnoj traki u vlažnoj komori proučavao najprije jonoforezu aminokiselina³⁾, a zatim sa Fischerom⁹⁾ i njihove komplekse s bakrom. Biserte¹⁰⁾ odvaja na taj način ne samo aminokiseline nego i polipeptide. Turba i Enenkel¹¹⁾ ispitivali su ljudski serum. Wieland i Wirth¹³⁾ prvi predlažu, da se serum aplicira u formi crte umjesto u formi kapi, koja ostavlja okruglu mrlju, jer je rastavljanje pojedinih proteina u formi tanjih ili debljih crta potpunije nego mrlje od mrlje. Grassmann i Hannig¹⁴⁾, Grassmann, Hannig i Knedel¹⁵⁾, Grassmann¹⁶⁾ i Knedel¹⁷⁾ usavršili su ovu metodu bojadisanjem proteinskih frakcija u elferogramu s bojom Amidoschwarz 10 B i direktnim fotometriranjem na papiru. Takova se aparatura može kupiti¹⁸⁾. Pored ovih autora Wallenfels i Pechmann¹⁹⁾ odijelili su po ovoj metodi amilazu, proteinazu, lipazu i fosfatazu. Kashiwagi²⁰⁾ razdvojio je kod pH 4—5 iz Donaggio pozitivnog urina 2 proteinske katodne frakcije.

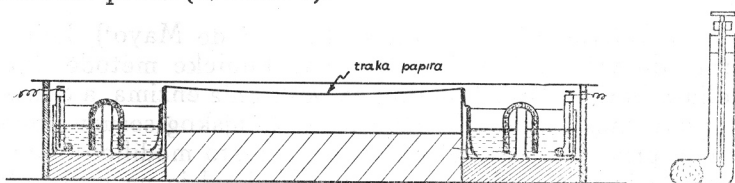
Kod svih dosadašnjih publikacija o elektroforezi na papiru navedeni su uslovi, pod kojima su autori radili. Nigdje se međutim ne nalaze podaci, kakove bi pogreške i promjene nastale, ako bi se od navedenih uslova odstupilo; u koliko su oni negdje i navedeni, često su nedovoljno obrazloženi i oskudni. Kritičkih studija metodike naročito s obzirom na fizikalno-kemijsku i teoretsku analizu samog procesa gotovo nema. Zato je svatko koji je htio da primijeni elektroforezu na papiru na svoja specijalna istraživanja iz bilo kojeg područja proteinske kemije, bio prisiljen, da počne gotovo iz početka. Budući da je većina istraživača nastojala, da svoju metodu udesi za rutinsku analizu seruma ljudske krvi, čime se u ostalom veći dio elektroforetskih istraživača i bavio²²⁾, zanemareno je ne samo

ispitivanje fizikalno-kemijskih pojava kod elektroforeze na papiru, nego i principijelnih razlika između gornjih triju metodika rada. Jedini je Durrum¹⁾ iznio vrlo značajna opažanja, a kasnije²⁾, i kritičku perspektivu svojeg načina rada i rada metode Cremer-Tiseliusa.

Cilj je ove radnje, da iznese rezultate, koje smo postigli sistematskim ispitivanjem uloge vodljivosti na stupanj razdvajanja komponenata smjese proteina, kao prvi dio proučavanja fizikalno-kemijskih promjena kod elektroforeze na papiru.

EKSPERIMENTALNI DIO

Kod naših ispitivanja služili smo se metodom elektroforeze na horizontalnoj traki. U drvenom okviru $54 \times 24 \times 10$ cm smještene su dvije staklene ploče 24×9.5 okomito u udaljenosti od 30 cm i jedna horizontalna staklena ploča 30×24 u visini od 5 cm od dna, tako da sa staklenim poklopcem zatvaraju komoru $30 \times 24 \times 5$ cm. Preko rubova okomitih ploča nategnute su dvije do pet traka filter papira (Whatman 1) 4 cm širine i 45 cm dužine tako, da se krajevi umoču u elektrodne posude postavljene tik staklenih ploča (v. sliku 1).



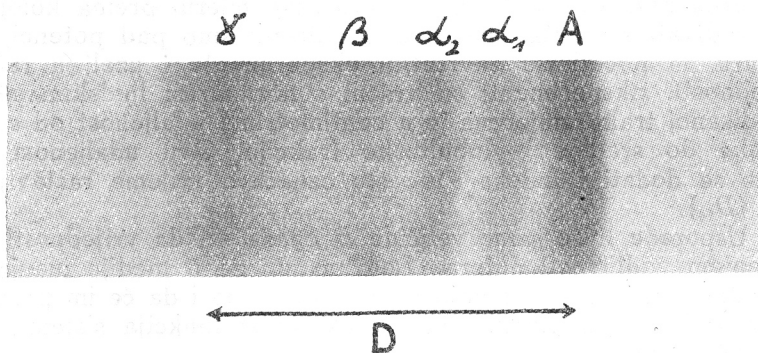
Sl. 1.

Na anodnoj i katodnoj strani nalaze se po dvije posude od jugovinila (PVC) $25 \times 5 \times 5$ cm. Prva posuda s puferom, u koju su umočeni krajevi papira spojena je elektrolitskim mostom s drugom. (»U« cijev s vatom). U drugoj se posudi s puferom nalazi elektroda u staklenoj »L« cijevi, dolje također zatvorenoj vatom. Katoda je ugljeni štapić, a anoda od platine. Cijeli je uređaj pokriven staklenom pločom, koja leži na drvenom okviru.

Kao izvor struje služi obični Philipsov ispravljač, koji daje prilično jednoliku istosmjernu struju. Eksperiment se postavlja tako, da se papirna traka umoči u pufer, ocijedi, nategne preko rubova staklenih ploča, i krajevi umoču u elektrodne posude, koje su do polovine napunjene puferom. Isto se tako napuni ili drugi par puferskih posuda. Na mjestu 6 cm udaljenom od staklene ploče katodne strane, olovkom se na traki unaprijed označi mjesto, gdje će se aplicirati smjesa bjelančevina. Nakon što se ostavilo barem 1 sat, da se vlažnost papira u komori ustali, pustji se iz pipete 0,01—0,02 ml ispitivane otopine (koja mora sadržavati 6—8% proteina) povlačeći polagano u poprečnom smjeru papira. U elektrodne se posude stave elektrode, drveni okvir pokrije staklenom pločom i uključi struja. U krug struje stavi se miliampermetar ili plinski kulometar. Plinским se kulometrom može kontrolirati, da li je za vrijeme eksperimenta bilo prekida struje gradske mreže²³⁾. Pad potencijala mjeri se voltmetrom velikog unutarnjeg otpora ili cijevnim voltmetrom na krajevima horizontalnog dijela trake, dakle od jedne staklene ploče do druge (30 cm). Eksperiment traje 16 sati. Svi su eksperimenti vršeni kod sobne temperature

(cca 23°C). Kad se struja prekine, horizontalni se dio trake otkine od krajeva i stavi na sušenje u termostat na 100°C. Osušena se traka bojadiše bromfenolnim modrilom^{2),4)} ili crnom bojom Amidoschwarz 10 B^{15),4)}. Kao primjer rastavljanja proteinskih frakcija dajemo elferogram ljudskog seruma (sl. 2).

Sl. 2.



Utjecaj pH pufera. Kod slobodne elektroforeze po Tiseliusu (vidi prikaz na našem jeziku⁸⁾ mnogo je istraživača ispitalo utjecaj pH pufera na odvajanje pojedinih komponenata seruma i plazme^{24),25)}. Puferima iste jonske jakosti može se odvojiti najviše komponenata kod pH 7,8 do 8,9. Globulin α_1 ne može se odvojiti od albumina u kiselijem puferu od pH 7,2. Albumin se kod pH 4 do 4,5 dijeli barem u dvije frakcije (A_1 i A_2). I mi smo kod elektroforeze na papiru uvidjeli da se α_1 globulin lakše odvaja u puferu pH 8,6 do 9. Albumin (Harvard) kod pH 4 putuje katodno, frakcija se razvlači, ali potpuno odvajanje A_1 od A_2 nismo postigli. Kod elektroforeze je neophodno potrebno, da se održava što konstantnija koncentracija H-jona, jer promjena pH utječe na pokretnost koloidnih čestica. Zato smo i mi radili sa većim količinama pufera, a uz to smo i same elektrode udaljili tako, da smo ih stavili u drugu posudu i u posebno odijeljenu cjevčicu. Na taj smo način postigli, da se pH pufera, u koji je umočen kraj trake, nije promijenio više nego za 0,05 pH.

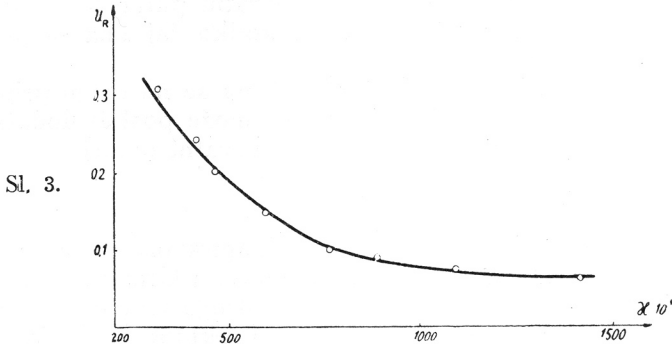
Utjecaj vodljivosti pufera. Glavni je cilj ove radnje bio, da pokažemo, koji faktori utječu na oštrije i prostorno udaljenije rastavljanje (separability, Auflösungsvermögen) pojedinih komponenata smjese proteina, jer je ta činjenica od presudne važnosti kod elektroforeze na papiru. Može li se fiksiranjem nekih veličina unaprijed odrediti, da frakcije budu oštre i dobro odvojene (kao što je to potrebno kod direktnog fotometriiranja na papiru¹⁵⁾ i kod izrezivanja cijelih pojedinih frakcija i njihovog eluiranja i fotometriiranja¹¹⁾ ili naprotiv daleko prostorno rastavljanje sa difuznim zonama, što je potrebno, kad se trake režu u podjednako široke vrpce, eluiraju i fotometriiraju^{2),4)}, onda se time kod elektroforeze na papiru dobiva značajna pomoć.

Opazili mo, da neke vrste pufera kao na pr. veronal-veronal Na $\mu=0,1$, pH 8,6 gotovo dvaput bolje rastavlja pojedine komponente krvnog seruma nego drugi puferi kao na pr. Michaelis pufer iste jonske jakosti i istog pH. Ovu smo pojavu podvrgli sistematskom ispitivanju i došli do rezultata

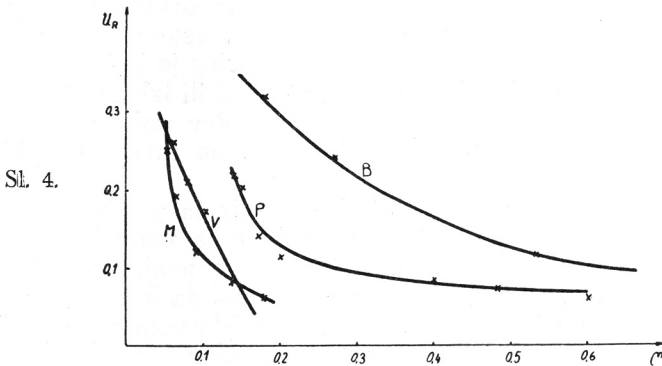
da je u elektroforezi na papiru vodljivost upotrebljenog pufera osnovni faktor, koji utiče na rastavljanje komponenata smiese proteina.

diagram. Na taj se način dobiva niz blizih, paralelnih krivulja. Mi smo uzeli srednje vrijednosti i prikazali rastavljanja jednom krivuljom. (sl. 3).

U literaturi se uvriježilo, da se za puferne, koji se upotrebljavaju kod elektroforeze s optičkom registracijom, navodi jonska jakost kao njegova karakteristika. Ta se praksa prenijela i na elektroforezu na papiru. Da ona nema naročito smisla, vidi se po tome, ako grafički prikazemo ovisnost



rastavljanja U_R o jonskoj jakosti μ (sl. 4) kod različitih pufera, pa dobivamo posve odvojene nekoherentne krivulje. To znači, da je rastavljanje u različitim puferima iste jonske jakosti različito, a prema tome i pokretnost koloidnih jona. Prema tome, ako za neki pufer nalazimo navedenu njegovu jonsku jakost, znamo samo to, kako ga možemo prirediti, a neznamo, koliku će pokretnost u njemu razviti izvjesni koloidni jon, a još manje, kakovu jonsku jakost treba da ima neki drugi pufer, da isti koloidni jon pokaže u njemu istu pokretnost. Uspoređivanjem sposobnosti rastavljanja prema



jonskoj jakosti različitih pufera je dakle neprovedivo. Uzmemo li na primjer boratni pufer $\mu = 0,1$ pokazat će se, da mu je vodljivost tako mala, da kod elektroforeze uopće ne odvajaju pojedinih frakcija; Michaelis pufer ove iste jonske jakosti naprotiv vrlo dobro rastavlja. Ako se usporede rastavljanja u različitim puferima iste specifične vodljivosti rezultiraju iste vrijednosti i analogni elferogrami. Sl. 4 prikazuje ovisnost rastavljanja

Ur o ionskoj jakosti. Krivulje za razne pufere: boratni B, fosfatni P, veronal V i Michaelis M.

Primjećujemo, da smo ujedno dokazali, da se s fosfatnim puferom dobivaju isto tako upotrebljivi rezultati kao i sa Michaelis puferom odnosno veronal-veronal-Na puferom, suprotno tvrđenju ranijih eksperimentatora, koji su fosfatni pufer odbacili kao neprikladan.

Nadalje smo s istim uspjehom uveli i boratni pufer te naglašavamo, da se sa svakim puferom može raditi, u koliko taj ima odgovarajuću vodljivost.

Ako pufersupstance imaju malu topivost, pa se ne mogu pripremiti u koncentracijama određene vodljivosti, ova se može postići dodatkom natrijevog klorida ili koje druge natrijeve soli (boratni pufer).

DISKUSIJA

Za vrijeme elektroforeze mora se traka papira promatrati dinamički. Tu treba odmah naglasiti, da između Durrumove i Grassmann-Hannigove metode s jedne strane i Cremer-Tiseliusove s druge strane, postoji principijelna razlika. Prve dvije metode rade bez direktnog hlađenja u vlažnoj komori, gdje se voda iz trake stalno isparava i prema tome pufer koncentrira, a treća radi među staklenim pločama hlađenim klorbenzenom i kod ove praktički nema zagrijavanja i gubitka vlage. Kao što smo već ranije naveli, mi smo najprije radili po metodi Cremer-Tiseliusa i dobivali upotrebljive rezultate, ali smo kasnije odustali od tog načina rada iz više razloga. Smetalo nas je brže putovanje proteina uz rub trake i uslijed toga nastalo superponiranje frakcija. Taj poznati »edge effect«, koji spominje i Durrum²²) velika je smetnja kod kvantitativnog evaluiranja. U koliko se taj efekt želi spriječiti, što je naročito poželjno kod određivanja pokretnosti koloidnih jona, mogu se uzeti i šire trake i promatrati putovanje po sredini. Kod užih traka može se »rubni efekt« otkloniti ispunjavanjem prostora od kraja trake do ruba staklenih ploča uskom vrpcom istog papira impregniranom silikonskim mazivom. Daleko je jednostavnije donju ploču uzeti od prikladne plastične mase i utisnuti ili izblanjati toliko plitki kanal, kolika je debljina papira. Mi smo također pokušali spriječiti taj efekt time, što smo rubove papira parafinirali, no time taj problem ipak nismo riješili.

Daljnja poteškoća te metode leži kod vadenja papira između ploča, jer se ne da zamisliti, da dio proteina ne ostane na samim pločama. Da se to spriječi, predlaže se mazanje ploča kapilarno neaktivnim tekućinama (antiwetting agents). Ako k svemu tome dodamo, da je aparatura po Cremer-Tiseliusu kompliciranija od ostalih, da je klorbenzen, pored navoda u literaturi o njegovoj neotrovnosti, vrlo neugodan i konačno, da je specijalno za nas nabavka originalnog peterostrukog Munktel 20 papira gotovo nemoguća, onda je razumljivo, da smo bili prisiljeni, da pređemo na mnogo jednostavniju metodu, koja radi na slobodno obješenoj traci u vlažnoj komori.

Razni su autori pokazali^{4, 15, 16, 17}), da postoji i kod ove metode dobro slaganje s rezultatima dobivenim s velikom elektroforetskom aparaturom, a također i dobra reproducibilnost. Samo zagrijavanje papira i opasnost alteracije proteina, nije najslabija strana ove metode. Veće se poteškoće

pojavljuju jedino kod analize pokretnosti koloida, rastavljanja i identifikacije nepoznatih komponenata smjese i to uslijed stvaranja gradienata vlažnosti, koncentracije elektrolita, pH, a s tim u vezi i pojave nejednolike vodljivosti duž trake, a isto tako i različitog pada potencijala. Budući da kod metode po Durrumu, gdje su trake strmo obješene, dolazi pored navedenih pojava još do izražaja i utjecaj sile teže na strujanje i kapilarni uspon pufera u traki, mi smo odabrali rad na horizontalnoj traki, da barem jedan suvišni utjecaj eliminiramo.

Kad se navlažena traka spoji s izvorom struje, odmah i istodobno nastupaju slijedeće pojave: 1) isparavanje vlage iz papira; 2) nadoknada isparene tekućine kapilarnim sifoniranjem iz katodne i anodne puferne posude; 3) elektroforeza koloida; 4) jonoforeza kationa i aniona i 5) promjena vodljivosti u traki i promjena gradienta potencijala uslijed gore navedenih razloga 1), 2), 3), 4).

Uslijed sifoniranja pufera s katodne strane nošeni su aplicirani proteini (6 cm od katodne strane) prema sredini, a istodobno se frakcije počinju rastavljati uslijed djelovanja električnog polja. Pošto je struja tekućine na mjestu aplikacije jača od endosmoze, γ -globulin se nalazi konačno uvijek anodno od starta. Stavi li se serum ili smjesa proteina na sredini trake i kod naše metode bit će pomak γ -globulina prema katodi. Mi smo polaznu točku stavili u blizini katodne strane, da bi pojedine frakcije imale što više mjesta za rastavljanje prije nego što stignu do »barijere«, koja se nalazi u blizini anodne strane kraja papira. U stvari barijera, za koju se smatralo, da nastaje uslijed promjena koncentracije pufera u traki i sprečava da najbrže frakcije ne mogu da otputuju sa papira ma kako dugo trajao eksperiment, ne postoji u tom smislu. Pokazano je kod amino-kiselina²⁸), da nakon određenog vremena dolazi do ravnoteže pokretnosti i da se pojedine amino-kiseline na koncu eksperimenta nalaze na identičnim udaljenostima od krajeva papira bez obzira na start. Arginin, kojemu je pokretnost veća nego strujanje tekućine iz puferskih posuda, otputovat će sa papirne trake (kod pH 2,6). Iako su rastavljanja u određenom puferu jednaka bez obzira aplicira li se proteinska smjesa na sredinu trake ili na krajevima, kod proteina još nismo opazili, da se pojedine frakcije konačno nalaze na posve identičnim mjestima. Dobiva se utisak, da strujanja tekućine u traki, nastaju li uslijed kapilariteta papira ili endosmoze, prenose translaciono cjelokupnu elektroforetsku sliku što konačno dovodi do gore navedenog rezultata t. j. praktičke neovisnosti rastavljanja o mjestu starta. Smetnje nastaju samo s puferima male vodljivosti (dakle velikog rastavljanja), jer su razrijeđeni i malog puferskog kapaciteta, pa nakon nekoliko sati dolazi do promjene pH pufera, koji kvari sliku elferograma.

Premda rezultati dobiveni na osnovu mjerenja jedinice rastavljanja U_R i njene ovisnosti o vodljivosti pufera pokazuju očitu zakonitost, ipak treba držati na umu, da svi naši osnovni podaci, sadrže eksperimentalne pogreške. Udaljenost D među sredinama frakcija albumina i γ -globulina mjerena je po individualnoj ocjeni. Napetost struje uzeta je na bazi jednostavne aritmetičke sredine početne i konačne voltaže. Kod određivanja vremena trajanja eksperimenta služili smo se običnim ručnim satom i zato smo

u formulu (III) uveli kao jedinicu sat, umjesto sekunde. Pored svih tih aproksimacija, dobili smo reproducibilne rezultate.

Da bi gornje postavke još bolje potvrdili i dobili definitivne vrijednosti u toku su egzaktni eksperimenti s izvorom struje stabilizirane napetosti.

Treba upozoriti, da je neophodno potrebno, da krajevi papirnih traka budu odvojeni od elektroda pouzdanim labirint-sistemom. Promijenjeni pufer na elektrodama ne smije da dođe u kontakt s umočenim krajevima papira. Taj je problem vrlo dobro riješen kod Grassmann i Hanninga¹⁵⁾, gdje se elektrode nalaze u jednoj posudi, a trake su umočene u drugoj, dok su posude spojene poroznim glinenim štapićem. Ovakova je aparatura zgodna za rutinski rad, kod kojeg se uvijek radi s istim puferom. Za naše eksperimente, gdje smo kod svakog pokusa mijenjali, ne samo koncentraciju pufera, nego i vrste pufera, morali smo dvije puferske posude spojiti elektrolitskim mostom, staklenom »U« cijevi ispunjenom vatom i navlaženom istim puferom.

Mnogi su se autori trudili²⁶⁾ 27) da potvrde mogućnost određivanja pokretnosti aminokiselina kod ovog načina eksperimentiranja. Pošto su mjerenja vršili samo do 6 sati trajanja, vjerojatno je, da kod tako kratkog toka struje postoji proporcionalnost putovanja s vremenom. Dokazano je baš kod aminokiselina²⁸⁾, da između gore navedenih faktora: strujanja tekućine s anodne i katodne strane, endosmoze i pokretnosti, dolazi konačno do ravnoteže, pa se pojedine aminokiseline nalaze na identičnim mjestima bez obzira na start. Prema obrazlaganju Durruma²²⁾, 28) dolazi do te ravnoteže pokretnosti onda, kada koloidni joni koji pod utjecajem električnog polja putuju protiv struje tekućine (u našem slučaju je ova na anodnoj strani pojačana elektroendosmozom) u svom »plivanju protiv struje« izjednače svoju brzinu s brzinom struje tekućine.

Između upravo navedenih eksperimenata²⁶⁾ 27) vršenih u horizontalnoj traki i drugih²⁸⁾ u strmoj traki ne smije se povući jednostavna analogija. Ipak ćemo napomenuti, da smo slične pojave opazili i kod naših eksperimenata. Premda s aminokiselinama još nismo radili, ustanovili smo da i kod proteina postoji u prvo vrijeme proporcionalno putovanje s vremenom, sve dok se ne postigne ravnoteža pokretnosti. Kad to ne bi bilo točno, ne bi postojalo ni proporcionalno rastavljanje. U intervalima od 4 sata, vadili smo pojedine paralelne trake i ustanovili, da se »ravnoteža rastavljanja« postizava za 16 sati i da se duljim trajanjem i do 28 sati ne mijenja, u koliko pH pufera ostane konstantan. Da bi se ogradili od eventualnog prigovora radi neproporcionalne pokretnosti koloidnih jona, mi smo kod svih eksperimenata uzeli iste uslove t. j. rastavljanje nakon 16 sati. Da je pokretnost jona, a prema tome i rastavljanje obratno proporcionalno, ne samo s jonskom jakošću²⁷⁾ nego i s koncentracijom pufera uopće definiranom njegovom specifičnom vodljivošću, spomenuto je više puta i vrlo je shvatljivo. Naši su eksperimenti međutim pokazali, da se pokretnost i rastavljanje u različitim puferima ne može uspoređivati na bazi jonske jakosti (μ), nego samo na osnovu vodljivosti. Usporede li se rastavljanja raznih pufera (sl. 4) u ovisnosti o μ dobiju se potpuno odvojene krivulje, prema kojima se ne može uspoređivati U_R različitih pufera.

Konačno određivanjem sposobnosti rastavljanja U_R dobiva se mjerilo pokretnosti i rastavljanja u određenom puferu neovisno o mjestu aplikacija

proteinske smjese, neovisno o eventualnoj neproporcionalnosti pokretnosti s vremenom i neovisno o eventualnom strujanju tekućine u traki izazvanom uslijed nejednakih nivoa pufera u posudama.

U daljnjim eksperimentima kanimo pokazati još i to, da se na osnovu tako određene jedinice rastavljanja dobiva mjerilo, pomoću kojeg se mogu identificirati, pojedine komponente smjese prema relativnom položaju od osnovne udaljenosti albumina i γ -globulina.

Zahvaljujemo ing. A. Jägeru, glavnom inženjeru Generalne Direkcije Kemijske Industrije N. R. H. i tehničkom direktoru tvornice »Optika« S. Koppelmannu za izradu posuda od jugovinila kao i studentu elektrotehnike B. Kaminskom za izradu crteža.

LITERATURA

1. E. L. Durrum, J. Am. Chem. Soc., **72** (1950) 2943.
2. H. Cremer u. A. Tiselius, Biochem. Z., **320** (1950) 273.
3. Th. Wieland, Ang. Chem., A, **60** (1948) 313.
4. F. V. Flynn and P. de Mayo, Lancet, **1951**, 235.
5. G. T. Mills and E. E. B. Smith, Bioch. J., **49** (1951) Proc. VI.
6. V. Schwarz, Nature, **167**. (1951) 404.
7. I. Berkeš, Liječ. Vjesnik, **73** (1951) 75.
8. I. Berkeš, Farm. Glasnik, **7** (1951) 257.
9. Th. Wieland u. E. Fischer, Naturw., **35** (1948) 29.
10. G. Biserte, Bioch. and Biophys., **A. 4** (1950) 416.
11. F. Turba u. H. J. Enekel, Naturw., **37** (1950) 93.
12. G. Körver, Klin. Wschr., **28** (1950) 693.
13. Th. Wieland u. L. Wirth, Ang. Chem., **62** (1950) 473.
14. W. Grassmann u. K. Hannig, Naturw., **37** (1950) 496.
15. W. Grassmann, K. Hannig u. E. Knedel, D. Med. Wschr., **76** (1951) 333.
16. W. Grassmann, Naturw., **38** (1951) 200.
17. M. Knedel, Med. Monatschr., **1951**, 707.
18. Bender u. Hobein, München-Zürich.
19. K. Wallenfels u. E. v. Pechmann, Ang. Chem. **63** (1951) 44.
20. T. Kashiwagi, Igaku to Seibutsugaku (Med. and Biol.) **18** (1951) 21.
21. I. Berkeš, Medika, **4** (1951) 53.
22. E. L. Durrum, Science, **113** (1951) 66.
23. I. Berkeš, Mikroch. ver. Mikroch. A. XL, (1952) 159.
24. W. Wiedemann: II. glava u knjizi Wuhrmann u. Wunderly: Die Bluteiweisskörper d. Menschen, Basel 1947.
25. Müllers, Müller and Eitelman, Arch. Biol., **29** (1950) 413.
26. H. J. McDonald, M. C. Urbin and M. B. Williamson, Science, **112** (1951) 227.
27. H. J. McDonald, M. C. Urbin and M. B. Williamson, J. Coll. Sci., **6** (1951) 236.
28. E. L. Durrum, J. Coll. Sci., **6** (1951) 274.

MEDICINSKO-KEMIJSKI INSTITUT

MEDICINSKI FAKULTET
ZAGREB

Primljeno 10. svibnja 1952.

ABSTRACT

Electrophoresis on Paper, I.

The Influence of the Conductivity of the Buffer on the Degree of Separation of the Components of a Mixture of Proteins

IVAN BERKEŠ and VINKA KARAS

The influence of the conductivity of the buffer on the mobility of colloid ions in the electrophoresis on filter paper has been studied in a great number of experi-

ments. On the assumption that the mobility does not show a linear proportionality with time at longer durations of the experiment, the separation of the human serum albumin from the γ -globulin in 16 hours is stated as the basic measure of separability. Thus, from different experiments and in different buffers there results the distance D which can be compared, if they are divided by the potential drop across the paper strip in V/cm and the time in hours. Their value obtained in this manner for one hour and for 1 V/cm has been named the separability (U_R). If U_R is plotted against the specific conductivity of the buffer used in the different dilutions, a curve is obtained which shows a regular rise in separability (resp. mobility, because the separability has the same physical dimension) with the decrease of conductivity. From four different buffers studied, very narrow parallel curves resulted. We derived a common curve on the base of the average values from the above mentioned parallel curves. By comparing the curves of separability obtained by plotting the figures of separability against ionic strengths of the buffers applied, a series of completely independent and incoherent curves results. The deduction therefrom is, that different buffers cannot be compared by their ionic strength considering their ability of separating protein mixtures in the paper electrophoresis. It is further emphasised, that both phosphate and borate buffers can be used with good results in paper electrophoresis if prepared in such a way that they have a corresponding conductivity.

Besides the enumeration of experimental data and the theoretical conclusions based on them, the three basic techniques in paper electrophoresis are reviewed. The way is also outlined for a systematic study of physico-chemical phenomena in the electromigration methods.

CHEMICAL INSTITUTE
MEDICAL FACULTY
ZAGREB, CROATIA

[Received, May 10, 1952]