

Papirna elektroforeza bjelančevina seruma I.

Prilog metodici papirne elektroforeze

NEBODAR ŠKARICA

Nakon velikih uspjeha klasične elektroforetske metode Tiselius-a za karakterizaciju bjelančevina i za njihovo analitičko odnosno preparativno odjeljivanje, pokušano je, uglavnom istodobno na više mjesta, pojednostavniti spomenutu metodu, ukloniti neke njezine nedostatke, a u prvom redu učiniti je pristupačnijom i skromnije opremljenim zavodima. Pokušaji, da se primjenom elektromigracije u nepokretnom mediju⁴⁸) (različiti geli, stakleni prah, azbest, filter-papir i sl.) uklone anomalije građjenata, kojih se učinak štetno očituje u slobodnoj elektroforezi, pa nastojanja, da se spriječe konvekcione struje i tako stabiliziraju pomične granične plohe, s druge pak strane najveći uspjesi papirne kromatografije i ostalih kromatografskih metoda primijenjenih u najrazličitijim granama kemije, imali su za posljedicu, da je rješenje problema pojednostavnjenja elektroforetskih postupaka traženo u vršenju elektroforeze u kapilarnim sistemima, u prvom redu na filter-papiru. Najprije su opisani postupci za papirno-elektroforetsko odjeljivanje (jonoforezu) amino-kiselina i drugih malenolekularnih, joniziranih spojeva, a zatim metode fracioniranja bjelančevina^{5, 6, 10, 11, 12, 19, 23, 25, 36, 39, 42, 44, 49}). Tako izrađene metode ubrzo su našle primjenu i u raznim područjima čiste kemije, i u mnogim njezinim primjenjenim granama, naročito u medicinskoj kemiji. Tu su u prvom redu došla do izražaja papirno-elektroforetska istraživanja bjelančevina normalnih i patološki promijenjenih seruma^{22, 24, 34}), cerebrospinalne tekućine^{4, 43}), mokraće³⁴), očne tekućine⁵²), encima^{15, 38, 50}), hormona odnosno hormonsko-proteinskih kompleksa^{16, 31, 37}), virusa¹), antigena⁴¹), hemolizata eritrocita⁴⁰), zatim određivanja pokretljivosti različitih proteinskih frakcija⁴⁵), njihovog sastava u pogledu amino-kiselina²⁰), njihove izoelektrične točke³²), pa istraživanja vezanja sulfamida na pojedine proteinske frakcije²⁶), uspoređivanja seruma raznih životinjskih vrsta¹⁴), izoliranja pojedinih proteinskih frakcija u svrhu daljeg, osobito serološkog, istraživanja¹³), i t. d.

Ubrzo nakon razradbe opisanih jednostavnijih uređaja za papirnu elektroforezu u analitičke svrhe, izrađeni su i složeniji uređaji za preparativno papirno-elektroforetsko fracioniranje bjelančevina seruma i drugih tvari^{3, 8, 17, 47}), kod kojih se putovanje čestica u električnom polju vektorski zbraja s putovanjem u struji otapala. Opisana je i dvodimenzionalna papirna elektroforeza⁹) u analogiji s dvodimenzionalnom papirnom kromatografijom. Objavljeno je već i nekoliko skupnih referata, posvećenih dje-

lomično ili posve papirnoj elektroforezi^{17, 21, 29, 44, 46}). Na području papirne elektroforeze radi se i kod nas^{2, 35}.*

U namjeri da papirno-elektroforetski proučimo bjelančevine seruma domaćih životinja, zdravih i bolesnih, nastojali smo, na temelju papirno-elektroforetskih metodika opisanih u literaturi, kao i na temelju vlastitih opažanja i iskustava, sakupljenih u nizu brojnih predpokusa, sastaviti do skrajnosti jednostavnu aparaturu, prikladnu za izvršenje velikog broja elektroforetskih određivanja odjedamput. U ovom saopćenju opisat ćemo naš eksperimentalni uređaj i postupak kao i stanovita iskustva i rezultate, do kojih smo došli u toku rada na ovom području, a ujedno ćemo se i kritički osvrnuti na razne metodičke pojedinosti papirno-elektroforetskih postupaka.

EKSPERIMENTALNI DIO

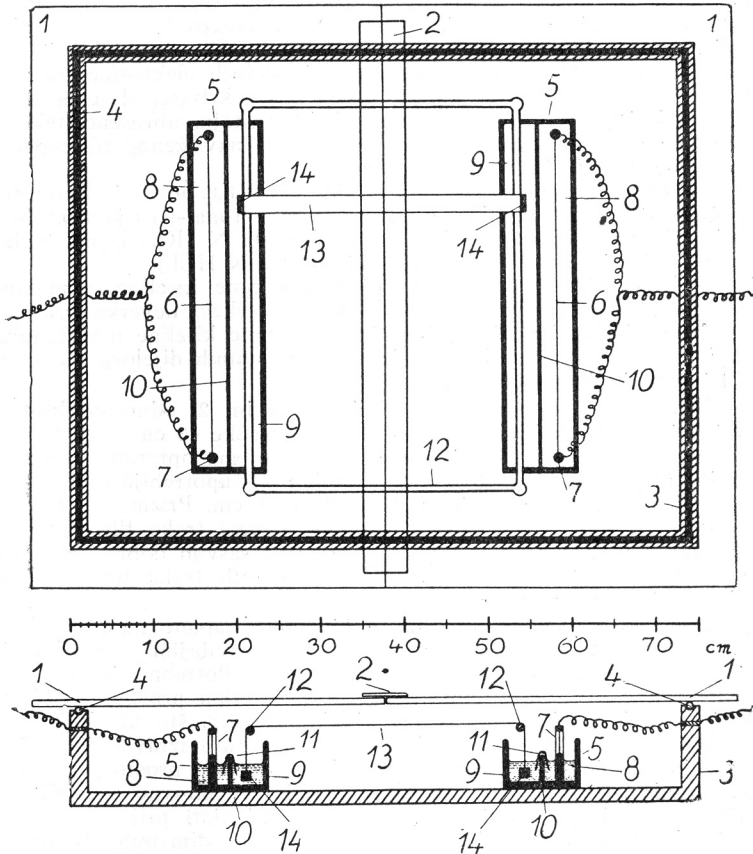
1. Princip papirne elektroforeze. Papirna elektroforeza u biti je slična slobodnoj elektroforezi: bjelančevina se rastavlja na frakcije zbog različite pokretljivosti pojedinih komponenata u električnom polju. Ta je pokretljivost, kod određenog gradijenta potencijala i temperature, funkcija, u prvom redu električnih svojstava proteinske čestice (koja zavise o aktuelnoj kemijskoj reakciji i aktivitetu elektrolita), a u drugom redu njezine veličine i oblika. Za razliku od slobodne elektroforeze, putovanje koloidnih jona bjelančevine ne zbiva se u homogenom mediju (puferu), već u kapilarnom sistemu — traki filter-papira, natopljenom prikladnim puferom. Traka filter-papira uronjena je svojim krajevima u elektrodne posude napunjene određenim puferom. Na traku se kapne otopina, koju želimo elektroforetski frakcionirati, pa se ukopča struja. Nakon elektroforeze, proteinske se frakcije mogu fiksirati na papir sušenjem, s pomoću raznih kemikalija i sl., i nakon toga obojiti. Obojena se traka može razrezati na pojedine zone, boja eluirati i kolorimetrijski odrediti, i na taj način izvršiti kvantitativna analiza početne smjese. Postoje također i drugi načini za kvantitativnu obradbu elektroferograma.

2. Aparatura. U nizu predpokusa, kojih rezultate posebno ne navodimo, uočili smo i upoznali najpodesnije uvjete za vršenje papirno-elektroforetskih istraživanja, pa smo sastavili slijedeći jednostavni uređaj, koji nam daje dobre rezultate.

Elektroforetska komora jest obična plosnata drvena kutija, iznutra parafinirana. Dimenzije kutije i ostalih dijelova vide se iz slike (v. sl. 1). Prednja je stijenka kutije za 2—3 cm niža od stražnje, tako da staklene ploče, kojim je kutija pokrivena, ne stoje sasvim vodoravno, nego su malo nagnute. To je potrebno zbog toga, da voda, koja destilira iz traka i kondenzira na pločama, ne bi kapala natrag na trake. Na gornjem rubu kutije, posvuda naokolo, izduben je kanal, u kojem se nalazi obična gumena cijev mekih stijenki. Kad se kutija poklopiti s relativno teškim staklenim pločama (debljina stakla 6—8 mm), spomenuta cijev priligne uz kanal i uz ploče, pa dobro zatvara kutiju, što je važno radi postizavanja i održavanja zasićenosti atmosfere vodenom parom u kutiji. Gumena cijev može se i vazelinirati, da još bolje zatvara prostor kutije. (Neki istraživači²⁷), da bi postigli potpunu hermetičnost, stavljaju u kanal živu.) U kutiji se nalaze 2 duge staklene kivete. (U

* U ovom kratkom skupnom prikazu ograničili smo se isključivo na papirno-elektroforetske metode istraživanja, i to samo bjelančevina. U pogledu frakcioniranja proteina u drugim poroznim ili galernim sistemima, kao i u pogledu frakcioniranja najrazličitijih drugih tvari (amino-kiselina, peptida, nukleotida, šećera, celuloze, te osobito amorganskih jona) upućujemo na spomenute skupne prikaze.

pomanjkanju takvih kivetova mogu se načiniti; slične kivete od plastične mase ili drveta, pa se također parafiniraju.) Kivete su po svojoj duljini podijeljene na 2 jednaka dijela okomitom staklenom pregradom, nešto nižom od samih kivetova. Preko te pregrade prebačena je traka filter-papira, koja tako stvara most između pravog elektrodnog prostora i prostora, u kojem su uronjene trake (srednjeg prostora).



Sl. 1. Aparatura za elektroforezu na filter-papiru u tlocrtu i nacrtu. 1: pokrovne staklene ploče; 2: staklena ploča, koja zatvara pukotinu između pokrovnih ploča, kad se te razmaknu; 3: drvena kutija; 4: gumena cijev u udubini na gornjem rubu kutije; 5: staklene kivete; 6: platinske žice (elektrode); 7: cijevčice s utaljenim platinskim elektrodama, napunjene živom radi boljeg spoja između dovodnih žica i elektroda; 8: elektrodni prostori; 9: srednji (unutarnji) prostori; 10: uzdužne pregrade; 11: mostovi od filter-papira; 12: stakleni okvir; 13: elektroforetska traka filter-papira; 14: olovne stezaljke za opterećenje trake.

Fig. 1. Paper electrophoresis apparatus, viewed from above and in front. 1: glass lids; 2: glass plate to cover the slit between the glass lids when they are separated; 3: wooden box; 4: rubber tube in groove carved in the upper edge of the box to insure its tightness; 5: glass cuvettes; 6: platinum wire electrodes; 7: tubes with fused in electrodes, partially filled with mercury, to make a better junction between the electrodes and the copper leads; 8: electrode compartments; 9: inner (middle) compartments; 10: glass partitions; 11: filter paper bridges; 12: glass support frame; 13: filter paper strip; 14: lead clips to hold the strip stretched.

Svrha je tog uređaja, da se promjene pH, koje nastaju u toku elektroforeze u okolini elektroda, ne prošire u prostor, u koji su uronjene trake ili čak i na same trake. Kao elektrode upotrebljavali smo ispočetka ugljene štapiće, a kasnije smo prešli na platinsku žicu, kojom se čišće radi. Naše platinske elektrode dugačke su uglavnom toliko koliko i same kivete, i to zbog toga da bi razmak (dakle i pad

potencijala) od elektrode do filter-papira za sve trake bio jednak, pa prema tome jednak i gradijent potencijala u svim trakama. Kasnije smo ustanovili, da se jednako dobro može raditi i s kraćom platinskom elektrodom smještenom bilo gdje u elektrodnom prostoru, i to poradi toga što pad napona kroz elektrolit — zbog velikog otpora u trakama — iznosi na putu od elektrode do trake jedva kojih 5% od ukupnog pada napona (a i tih 5% otpada dobrim dijelom na opisane mostove između srednjih i elektrodnih prostora). U kutiju se još stavlja okvir od staklenih štapova, preko kojeg se prebacuju i koji pridržava trake za elektroforezu. Na uglovima tog okvira nataljene su 4 staklene noge, koje, da bi položaj stalka u kutiji bio fiksiran i idealno horizontalan (što je važno za dobivanje dobrih elektroferograma), pristaju u četiri pripadne udubine u dnu kutije. Kutija je pokrivena dvjema debljim staklenim pločama, koje su po sredini, tamo gdje se sastaju, ubrušene, tako da kutiju dobro zatvaraju. Dobro je na dno kutije razmjestiti navlaženog filter-papira, da se vlažna komora što brže zasiti vodenom parom.

3. *Reagensi.* a) Pufer: 0,1 M veronal-acetat, pH = 8,6, $\mu = 0,1$. Pufer se pripravi tako, da se jednaki volumni dijelovi otopina 0,1 M veronal-natrija i 0,1 M natrijeva acetata pomiješaju, pa dobivenoj smjesi doda toliko 0,1 N HCl, da pH bude $8,6 \pm 0,1$. (Za 2 l spomenute smjese potrebno je oko 170 ml 0,1 N HCl.)

b) Otopina za bojenje: 10% (v/v) otopina octene kiseline u metanolu, zasićena amido-crnilom (»Amidoschwarz 10B«, »Bayer-Werke«, Leverkusen).

c) Otopina za ispiranje: 10% (v/v) otopina octene kiseline u metanolu.

d) Otopina za eluiranje: smjesa od jednakih volumnih dijelova metanola i vode, zasićena natrijevim karbonatom.

4. *Izvedba elektroforeze.* Filter-papir »Whatman« br. 2, odnosno druga vrst prikladnog papira, izreže se na trake široke 2 cm, a dugačke 43 cm (duljina traka ravna se prema dimenzijama aparature). Trake se na krajevima opterete zgodnim utezima. U tu se svrhu mogu upotrijebiti stakleni štapići; mi upotrebljavamo olovne utege, koji su napravljeni iz malih olovnih prizama $2 \times 1 \times 1$ cm. Prizme se uzdužno zarezuju skoro do kraja, i u tako nastali procijep stavi se kraj trake filter-papira. Ako se sad takva olovna stezaljka prstima čvrsto stisne, ona sasvim dobro drži traku. Trake se prebace preko stalka, ostavljajući između pojedinih traka po nekoliko milimetara razmaka. Naš stalak nosi maksimalno 18 traka.

U međuvremenu se sva 4 prostora u kivetama napune puferom do par milimetara ispod ruba srednje uzdužne pregrade, a u srednjim prostorima još i niže, zbog dizanja razine pufera nakon uronjavanja traka. Potrebno je paziti, da razine pufera nakon uronjavanja traka budu u sva 4 elektrodna prostora približno u istoj horizontalnoj ravni, jer inače trake djeluju kao teglice, što uzrokuje pomak proteina na trakama, a eventualno i lošije slike. Spomenuto izravnane razine lako se postiže opreznim dolijevanjem pufera, no elektrodni se prostori mogu pretvoriti i u spojene posude sistemom gumenih cijevi⁹⁾, koje se, naravno, za vrijeme elektroforeze isključe. Razmjerno skupi pufer ne treba mijenjati prije svakog oglada, no dobro je češće kontrolirati kapacitet pufera. Mi vršimo istim puferom redovito četiri oglada s po 18 traka, pri čemu sukcesivno mijenjamo smjer elektroforeze (polaritet elektroda). Nakon tako proteklih 0,6—0,7 ampersati, tekućinu iz elektrodnih prostora bacima, tekućine iz srednjih prostora pomiješamo i premjestimo u elektrodne prostore, a srednje prostore napunimo svježim puferom. Kad su kivete spremne, stalak s trakama oprezno se uloži u kutiju, kutija poklopi, a zatim se pusti, da se trake same napiju pufera kapilarnim usisavanjem. Barem 5 minuta nakon što su se fronte pufera po sredini traka spojile, stakleni se pokrovi malo razmaknu, i kroz tako nastalu pukotinu stavlja se po 10 μ l serumu. Pukotinu je dobro držati pokrivenu oduljom staklenom pločom. Serum se stavlja iz graduirane mikropipete, u crti dugačkoj ca 10—12 mm, po sredini trake i okomito na nju. Nakon što su sve trake tako pripravljene, stakleni se pokrovi opet sastave, pričekaju se još $\frac{1}{2}$ do 1 sat, da se prilike u komori uravnoteže, a onda se ukopča struja. Mi upotrebljavamo istosmjernu filtriranu struju iz jednostavnog elektronskog ispravljača nestabiliziranog napona od 150 V. (U pokusima s idealno istosmjernom strujom iz akumulatorske baterije od 120 V nismo dobivali bolje rezultate.) Vrijeme trajanja elektroforeze zavisi o dimenzijama traka, upotrebnoj napetosti, stupnju rastavljanja, koji se želi postići i t. d. Nakon 20 do 30 sati struja se prekine, stalak s trakama izvadi, utezi posuše od suvišna pufera ili se jednostavno odrežu (pri čemu treba trake uz stalak

fiksirati s pomoću 2 staklena štapa), a stalak s trakama osuši u termostatu (15 minuta kod 105—110°C). Zatim se odrežu oni dijelovi traka, za koje se pretpostavlja da sadržavaju bjelančevinu, pa se pristupa bojenju. Mi bojimo trake u plitkoj staklenoj kadi, pokrienoj brušenim staklenim poklopcem. Trake se najprije boje 30 minuta u opisanoj otopini za bojenje, a onda se navedenom otopinom za ispiranje ispiru 5 do 6 puta po 10 do 15 minuta, da se ukloni suvišak boje. To ne uspijeva potpuno, pa dijelovi traka, na kojima nije ni bilo bjelančevine, ostanu svjetlo plavi. Napokon se trake još 1—2 put kratko provuku kroz eter, i zatim puste da se osuše. Za eluiranje boje, trake se razrežu na pojedine dijelove, koji odgovaraju pojedinih frakcijama bjelančevine, a s oba kraja trake uzmu se 2 komada, na kojima nije ni bilo bjelančevine (☉ ogled). Duljine izrezanih dijelova izmjere se (u mm), da bi se ekstinkcije eluiranih dijelova s bjelančevinom mogle kasnije korigirati za ☉ ogled, t. j. za boju vezanu na celulozu. Pojedini se dijelovi eluiraju u epruvetama, svaki s po 6 ml otopine za eluiranje. Nakon 2 do 3 sata, a još bolje nakon stajanja preko noći, eluirana se boja fotometriira. Mi radimo s Fisherovim elektrofotometrom, prilagođenim za obične četverouglate kivete kakve se upotrebljavaju u Pulfrich-ovu fotometru. Radimo s kivetama od 1 cm, i sa zelenim filtrom, koji propušta relativno široku spektralnu vrpču u području od 525 m μ . Nakon što se ekstinkcije korigiraju za ☉ ogled (uzevši u obzir duljine pojedinih dijelova), izračuna se sastav analizirane bjelančevine u relativnim procentima na taj način, da se sve korigirane ekstinkcije pojedinih frakcija zbroje, a pojedine ekstinkcije izraze u procentima tog zbroja. Ako je paralelno izvršeno određivanje ukupne bjelančevine u dotičnom serumu, onda se lako izračunaju i apsolutni procenti pojedinih komponenata.

U stanovitim patološkim slučajevima teško je odijeliti pojedine frakcije na traci. U takvim slučajevima, ili uopće, ako se želi imati elektroforetski diagram dotičnog seruma sličan diagramima slobodne elektroforeze, traka se ne reže na opisani način, već se izreže na pruge jednake širine (3—5 mm), koje se označe brojkama i eluiraju na jednak način. Ako se na apscisu nanesu brojčane oznake tih pruga, a na ordinatu pripadne ekstinkcije, dobivaju se poznati diagrami, koji se onda integriranjem na uobičajen način preračunaju u relativne procente.

DISKUSIJA O METODICI

1. Aparatura. Kad bi se papirna elektroforeza vršila na otvorenom prostoru, trake bi se brzo osušile radi spontanog ishlapljivanja vode, koje je kod elektroforeze još i nešto pojačano zbog Joule-ove topline, koja se razvija u trakama u tijeku elektroforeze. Radi toga je potrebno elektroforezu vršiti u zatvorenu sistemu. Osim toga neki istraživači nastoje, da prikladnim uređajem uklanjaju suvišnu toplinu, održavajući na taj način temperaturu traka približno konstantnom. Tako Cremer i Tiselius⁵⁾ stavljaju trake između staklenih ploča, pa sve skupa urone u klorbenzol, a Michl¹⁰⁾ uranja traku izravno u toluol. Drugi pak ne upotrebljavaju nikakvu tekućinu za hlađenje, nego trake drže u »vlažnoj komori«, t. j. u zatvorenom prostoru zasićenom vodenom parom. Mi smo se priklonili ovom drugom načinu, jer je zgodniji za obradbu velikog broja paralelnih ogleda, jer otpada dosta neugodno manipuliranje s klorbenzonom, i jer metoda s primjenom klorbenzola ima i drugih nedostataka¹²⁾. Osim toga po metodi s klorbenzonom ne dobivaju se tako dobra frakcioniranja kao po metodi u vlažnoj komori, što priznaju i oni istraživači, koji inače rade po prvoj metodi¹⁴⁾. Metoda s klorbenzonom naročito je prikladna, kad do rezultata treba doći brzo (na pr. kod kliničko-kemijskih analiza) jer se zbog hlađenja mogu upotrijebiti veće napetosti. Nama je pak u prvom redu bilo stalo do mogućnosti, da velik broj ogleda izradimo odjedamput.

U pogledu načina vješanja traka u vlažnoj komori jedni preporučuju, da se traka prevjesi po sredini preko štapića ili žice i pusti da obje polo-

vice trake, skoro okomito, slobodno vise u vlažnoj komori⁶⁾, dok drugi razapinju traku tako, da je ona više ili manje vodoravno napeta⁴⁹⁾. U prvom se slučaju istraživana otopina kapne na sredinu trake, dakle baš na ono mjesto, na kojem je traka u dodiru sa štapićem ili žicom, preko kojih je prevješena. Mi smo opazili, da se kod takve izvedbe često put na tom mjestu zadrži malo bjelančevine, zbog čega se kasnije, nakon obojenja, vidi i trag nosača trake. Osim toga, kod takvog načina vješanja traka, prilike u traci (vlažnost, otpor, gradijent potencijala) zavise u stanovitoj mjeri, zbog hidrodinamične ravnoteže između kapilarnih i gravitacionih sila, o udaljenosti od razine pufera odnosno vrha trake⁶⁾, što može utjecati na elektroforetsko frakcioniranje. Zato smo se radije priklonili drugom načinu, t. j. trake opterećujemo na krajevima i prebacujemo ih preko prikladnog stalka tako, da su napete u vodoravnom položaju. Na taj način onaj dio trake, preko kojeg putuje bjelančevina, nije u dodiru ni s kakvim stranim tijelom. Nismo mogli opaziti, da bi se u pojedinim dijelovima trake »nakupljao pufer«⁶⁾, što bi se inače očitovalo u nejednolikom padu napetosti uzduž trake i lošijem frakcioniranju.

Za mjesto stavljanja seruma izabrali smo sredinu trake, jer se, prema našem iskustvu, u tom slučaju pojedine frakcije najljepše odjeljuju, a rezultati, osobito u pogledu daljine putovanja frakcija, daju najbolje reproducirati. To je važno osobito onda, kad se radi sa serumima različitih životinjskih vrsta, i to zbog identifikacije pojedinih globulinskih frakcija. U slučaju, kad se radi sa serumima jedne te iste vrste, ili ako se želi iskoristiti cijelu duljinu trake, ili se želi trajanje frakcioniranja produžiti, serum se može staviti i na koje drugo mjesto trake, bliže katodi.

2. *Filter-papir.* Vrst filter-papira od velike je važnosti za dobivanje dobrih elektroferograma. S mnogim vrstama filter-papira (većinom nepoznate proizvodnje) dobivali smo loše, pa i posve neupotrebljive slike. Najbolje rezultate dobivali smo pri upotrebi papira »Whatman« br. 1 i 2 i »Munktell« br. 20. Papirom »Munktell« br. 20 peterostruke debljine⁵⁾ nismo dobivali tako dobre rezultate. Čini se, da je jakost struje kod rada s tim papirom prevelika, pa se tim papirom postižu najbolji rezultati samo uz hlađenje.

3. *Električni uvjeti; dimenzije traka.* Upotrebljena napetost ne smije biti preniska, jer su u protivnom slučaju gradijent potencijala, dakle i brzina putovanja proteinskih frakcija, premali, t. j. vrijeme potrebno za dobro odjeljivanje pojedinih frakcija predugo. S druge strane, previsoka napetost uzrokom je prejake struje, što dovodi do prevelikog ugrijavanja, isparavanja vode, strujanja elektrolita u traki i t. d. Iako neki istraživači radije upotrebljavaju razmjerno visoke napetosti odnosno gradijente potencijala (od nekoliko stotina volta sve do 1000 V^{9, 36)}, uz pripadno kraće trajanje elektroforeze, mi smo radije primijenili niže napetosti (150 V) i zato dulje trajanje elektroforeze (20 do 30 sati). S obzirom na jakost polja važna je naravno i duljina trake, za koju također postoji neka srednja optimalna vrijednost. Širina trake nema za sam tijek elektroforeze naročita značenja. Mi u pravilu radimo s relativno uskim trakama (2 cm) i na svaku traku stavljamo po jedan serum. No vršili smo pokuse i s mnogo širim trakama, na koje smo stavljali po više seruma paralelno jedan do drugog. Upotrijebili smo što više i »traku« široku jedno 40 cm (t. j. maksimalne ši-

rine s obzirom na dimenzije naše aparature), na kojoj smo paralelno stavili po 10, pa i više različitih seruma. U svim se tim slučajevima dobivaju dobra elektroforetska frakcioniranja. No s obzirom na kasnije kvantitativno iskorištenje dobivenih elektroferograma (rezanje, eluiranje i t. d.) rad se s pojedinačnim — 2 cm širokim — trakama pokazao kao najprikladniji.

4. *Pufer*. Pufer treba da ima s jedne strane što veći kapacitet, jer su tada dobivene frakcije oštrije ograničene, s druge pak strane što manju vodljivost, radi Joule-ove topline. Ako se još uzme u obzir utjecaj jonske jakosti na elektroforetsku pokretnost proteina, onda je očito da za neki određeni pufer postoji stanovita optimalna koncentracija za izvedbu elektroforeze. Mi smo okušali nekoliko različitih puferskih sistema, koji se obično upotrebljavaju kod papirne elektroforeze, tako na pr. 0,05 M veronal-pufer⁵⁾, pa veronal-acetat pufer¹⁹⁾, i to u različitim koncentracijama. Pri tom smo općenito opazili, da je brzina putovanja proteinskih frakcija to veća, a same frakcije to slabije ograničene (difuzne), što je koncentracija pufera manja. Veronal-acetat pufer, pH = 8,6, $\mu = 0,1$ učinio nam se najprikladnijim, pa ga u našoj standardnoj metodi isključivo i upotrebljavamo. Pripravljamo ga bez dodatka natrijeva klorida, a potrebnu jonsku jakost postizavamo podešavanjem koncentracija veronal-natrija, natrijeva acetata i solne kiseline.

Opisani pufer upotrebljavamo i za životinjske serume, a ne samo za humane, iako je poznato, da za serume različitih životinjskih vrsta postoje različiti puferi, koji daju optimalna frakcioniranja. Tako je na pr. za frakcioniranje konjske plazme klasičnom metodom prikladniji fosfatni pufer pH 7,7, nego veronal-pufer pH 8.6³⁰⁾. No kako pitanje optimalnih pufera za papirno-elektroforetsko frakcioniranje različitih životinjskih seruma nije još istraženo, to zasad upotrebljavamo opisani veronal-acetat pufer.

5. *Stavljanje seruma*. Stanovita mala količina seruma (1—50 μ l) kapne se obično na puferom ovlaženu traku. Mnogi autori ne nanose serum u obliku kapi već crtasto, okomito na smjer trake. Takav način je i po našem iskustvu bolji, jer se dobiju oštrije ograničene frakcije. Neki istraživači^{6, 34, 42)} stavljaju serum na suhi papir, kojega odmah zatim ovlaže puferom. Držimo, da to nije dobro, jer se u tom slučaju jedan (doduše mali) dio bjelančevine tako čvrsto veže na papir (uz istodobno eventualno denaturiranje), da kasnije ne putuje sa svođ početnog položaja. Spomenuto vezanje malih količina bjelančevina na suh papir mnogo je manje (praktički nikakvo), ako se serum prije elektroforeze razrijedi s puferom ili fiziološkom otopinom, ili ako se nativni serum stavi na traku, koja je nekoliko sati, ili preko noći, stajala u vlažnoj komori, i tako došla u ravnotežu s okolnom atmosferom, zasićenom vodenom parom. No kako prvi način umanjuje točnost kvantitativne obrade elektroferograma (jer je premalo bjelančevine), a drugi način produbljuje trajanje cijelog postupka, a razrijedi se i pufer s kojim se kasnije traka natopi, to držimo, da je najzgodnije serum stavljati onako, kako je opisano u eksperimentalnom dijelu.

6. *Tok elektroforeze*. Kod naše aparature jakost struje u toku elektroforeze polagano i neprestano raste. Tako je na pr. u jednom našem tipičnom ogledu od 18 traka po 2 cm širine, ukupna jakost struje porasla nakon 20 sati sati od 5,7 mA na 6,7 mA. Uzroci su toj pojavi različiti. Iako još nismo vršili kvantitativna mjerenja o relativnom udjelu pojedinih faktora

u porastu jakosti struje, ipak na temelju jednostavnih pretpokusa držimo, da ih ima barem tri: koncentriranje pufera u trakama, elektrodne reakcije i porast temperature. Joule-ova toplina, koja se razvija u trakama, kompenzira se konvekcijom u atmosferi vlažne komore, a i laganim ishlapljivanjem vode iz traka, što ima za posljedicu kapilarno usisavanje pufera iz elektrodnih posuda i s tim u vezi polagano koncentriranje pufera odnosno povećanje njegove vodljivosti. Taj je efekt mnogo veći, ako vlažna komora nije dobro zatvorena; no on postoji i kod hermetički zatvorene komore, jer voda iz traka jednostavno destilira i kondenzira na hladnijim dijelovima komore. Povišenje temperature traka, u toku elektroforeze pod našim pokusnim uvjetima, vrlo je maleno, jedva kojih 1—2°C iznad okolišne temperature. U koliko jakost struje nije prevelika, to se u pogledu temperature uskoro nakon početka elektroforeze uspostavi stacionarno stanje, a Joule-ova toplina kompenzira na opisani način. No koliko god je porast temperature malen, ipak i on sigurno utječe na porast vodljivosti sistema. Napokon, u toku elektroforeze zbivaju se na elektrodama elektrodne reakcije, zbog kojih dolazi do porasta koncentracije H^+ odnosno OH^- u dotičnim elektrodnim prostorima (što se očituje u promjeni pH). Kako su vodljivosti tih jona mnogo veće od vodljivosti ostalih jona, to su spomenute reakcije također faktor, koji utječe na povećanje vodljivosti cijelog sistema. Mi nismo mogli opaziti, da bi opisani efekti (porast temperature i jakosti struje) loše utjecali na frakcioniranje pojedinih komponenata seruma, pa stoga nismo ni nastojali, da reguliranjem napetosti ili otpora u toku elektroforeze, održimo jakost struje konstantnom.

Brzina putovanja pojedinih frakcija nije konstantna, nego se u toku elektroforeze polako umanjuje, to više, što je jakost struje veća. Uzrok je toj pojavi u prvom redu opisano koncentriranje pufera u trakama, zbog kojega dolazi do porasta njegove jonske jakosti, što pak ima za posljedicu umanjenje zeta potencijala, pa prema tome i brzine migracije koloidne čestice. Za umanjenje brzine putovanja odgovoran je manjim dijelom i pad gradienta potencijala uzduž trake, do kojeg dolazi radi opisanog porasta jakosti struje, koliko se dakako radi s nestabiliziranim izvorom struje. (Na pr. u našem slučaju, ako struja naraste za 1 mA, ukupna napetost padne za kojih 6 V.) Napokon na brzinu putovanja proteinskih frakcija na traki utječe u stanovitoj mjeri i opisano kapilarno usisavanje pufera iz elektrodnih posuda, koje na jednoj polovini trake ubrzava, a na drugoj polovini trake usporava elektromigraciju bjelančevina, i to toliko više, što je proteinska frakcija više udaljena od sredine trake⁷⁾. Taj gradient brzine strujanja pufera zapravo je dodatna komponenta u putovanju proteina, koja se superponira primarnom putovanju koloidne proteinske čestice u električnom polju i sekundarnom elektro-osmotskom efektu. Kod dovoljno velikih jakosti struje, spomenuti gradient strujanja pufera može postati tako velik, da poništi elektromigraciju bjelančevina, koje onda »putuju ostajući na mjestu«. Na toj se pojavi temelji Durrum-ov fenomen mobilne ravnoteže⁹⁾. Kod još većih napetosti, efekt isparavanja i kapilarnog usisavanja pufera tako je velik, da strujanje pufera nosi bjelančevinu u protivnom smjeru, nego što bi ona po svom naboju trebala putovati.

Kod naše izvedbe papirne elektroforeze opisani efekti na utječu u velikoj mjeri na migraciju proteinskih frakcija, no oni ipak modificiraju

njihovu brzinu putovanja tako, da određivanje elektroforetske pokretljivosti pojedinih frakcija u apsolutnim jedinicama u svrhu njihovog kvalitativnog karakteriziranja nailazi kod papirne elektroforeze na velike poteškoće. No to ni u ovom pogledu ne umanjuje značenje papirne elektroforeze, jer se mogu paralelnim postavljanjem normalnih seruma ili standardnih tvari dobiti isporodbene točke za barem približno ustanovljenje pokretljivosti pojedinih frakcija. U novije vrijeme uspjelo je²⁵⁾ opreznim izvođenjem papirne elektroforeze, uz strogu kontrolu isparavanja, promjena aktuelne kemijske reakcije, strujanja pufera iz jedne elektrodne posude u drugu i sl., te nakon korekcije za elektro-osmozu i za neravan put koloidne čestice, razmjerno točno odrediti pokretljivost albumina humanog seruma u apsolutnim jedinicama.

Kod velikog broja paralelnih oglada praktično je na jednu traku staviti iktერიჩან serum s pozitivnim direktnim van den Bergh-om¹²⁾, pa se tako može pratiti putovanje albumina, koji su sada zbog vezanog bilirubina žuto obojeni.*

7. *Bojenje.* Nakon dovršene elektroforeze osušena se traka oboji prikladnom bojom. U literaturi za tu svrhu najčešće preporučuju ove boje: bromfenolno modrilo^{5, 6)}, amido-crnilo⁴⁹⁾ i azokarmín⁴⁹⁾. Mi smo iskušali prve dvije boje, a odlučili smo se za amido-crnilo, premda i bromfenolno modrilo ima stanovite prednosti. Ono se naime daje izvrsno isprati iz filter-papira, što se za amido-crnilo ne može reći. No količina amido-crnila vezanog na bjelančevinu, odnosno tome pripadne ekstinkcije — za razliku od količine i ekstinkcija brofenolnog modrila — nekoliko su puta veće, tako da se može udobno raditi s 10 μ l seruma odnosno cca 0,5—1 mg bjelančevine. Nadalje, vezivanje bromfenolnog modrila na globulinske frakcije bjelančevine nije jednako vezivanju na albumine, pa stoga treba ekstinkcije kod globulinskih frakcija množiti s empirički ustanovljenim faktorom 1,6⁵⁾. Kasnije je ustanovljeno²⁴⁾, da taj faktor nije jednak za pojedine frakcije globulina, a isto tako da se znatno mijenja kod različitih patološki promijenjenih seruma. Naprotiv, kod amido-crnila vezivanje boje na pojedine proteinske frakcije mnogo je ravnomjernije i približno je proporcionalno količini bjelančevine bez obzira, o kojoj se frakciji radi. Grassmann¹⁹⁾ drži, da je spomenuto vezivanje u tolikoj mjeri proporcionalno količini bjelančevine, da ekstinkcije za pojedine frakcije i ne treba množiti s nekim korekturnim faktorom. Witmer⁵²⁾ naprotiv drži, da ekstinkcije svake pojedine frakcije ipak treba množiti s posebnim faktorom. To se pitanje, razumije se, može riješiti samo uspoređivanjem velikog broja rezultata analiza normalnih i patoloških seruma, izvršenih papirno-elektroforetski i klasičnim metodama, kao što je već učinjeno za Cremer-Tiselius-ovu metodu bojenja s bromfenolnim modrilom²⁴⁾. Nama to za sada nije bilo moguće izvršiti, pa zbog toga izračunavamo rezultate uz pretpostavku, da je količina boje proporcionalna količini bjelančevine, bez obzira o kojoj se proteinskoj frakciji radi.

Pitanje korekturnih faktora, s kojima treba množiti ekstinkcije pojedinih eluata, da bi se dobile vrijednosti proporcionalne količini pojedinih

* Mi smo se tim načinom morali gotovo redovito služiti, jer inače, zbog čestih prekida u gradskoj električnoj mreži, ne bismo znali, da li je elektroforeza uopće potekla, odnosno, koliko je uznapredovala.

proteinskih frakcija, unosi najviše nesigurnosti u papirno-elektroforetsku metodu i jedan je od glavnih uzroka većeg ili manjeg neslaganja s rezultatima dobivenim klasičnom Tiselius-ovom metodom²⁴). To osobito vrijedi za patološke serume, kod kojih su kvantitativni odnosi vezivanja pojedinih boja na pojedine proteinske frakcije još slabo istraženi.

I vrijeme bojenja trake potrebno je standardizirati jer, kako su i drugi opazili¹²), i bjelančevina i celuloza stajanjem u otopini boje još dugo vezuju boju. No predugo bojenje nije poželjno, jer tada adsorpcija boje na celulozu relativno pretegne vezanje boje na bjelančevinu i filter-papir se kasnije teže ispiru. Optimalno vrijeme bojenja iznosi prema našem iskustvu oko $\frac{1}{2}$ sata.

Nakon ispiranja s octeno-kiselim metanolom suvišnu octenu kiselinu najbolje je ukloniti eterom, nakon čega se trake i brzo posuše. Za uklanjanje octene kiseline ne valja upotrebiti čisti metanol, jer on eluira i boju.

8. *Eluiranje.* Obojena i osušena traka može se izrezati na velik broj uskih pruga jednake širine⁵), a mogu se izrezati i područja, koja odgovaraju samo pojedinim frakcijama. Izrezani se dijelovi eluiraju, a eluati fotometričaju. Prvi je način mnogo dugotrajniji, no ima svoje prednosti. Po njemu se dobivaju krivulje više ili manje slične poznatim krivuljama dobivenim u slobodnoj elektroforezi. Integriranjem tih krivulja računaju se relativni procenti pojedinih frakcija. Osim toga, u stanovitim, naročito patološkim slučajevima, za interpretaciju elektroferograma važan je i izgled krivulje; na pr. nije svejedno, da li se povećanje γ -globulinske frakcije očituje u više ili manje ravnomjernom povećanju iznad cijele baze γ -globulina, što je znak njihove heterogenosti, ili se radi o jednom oštrijem maksimumu — dakle o jednoj relativno homogenoj bjelančevini — koji se izdiže iz temeljne γ -globulinske mase¹⁹). Knedel²²) na pr. nalazi, da je kvocijent između visine i baze γ -frakcije kod stanovitih oboljenja jetre karakteristično manji od 1, što se naravno može ustanoviti kvantitativnom obradom elektroferograma samo po prvom opisanom postupku. No radi prilične nesigurnosti cjelokupne metode uopće, a kod primjene prvog načina i radi znatnijeg utroška vremena i materijala, naročito kod velikog broja ogleđa, mi smo trake u pravilu, osim u iznimnim slučajevima, radije rezali prema frakcijama.

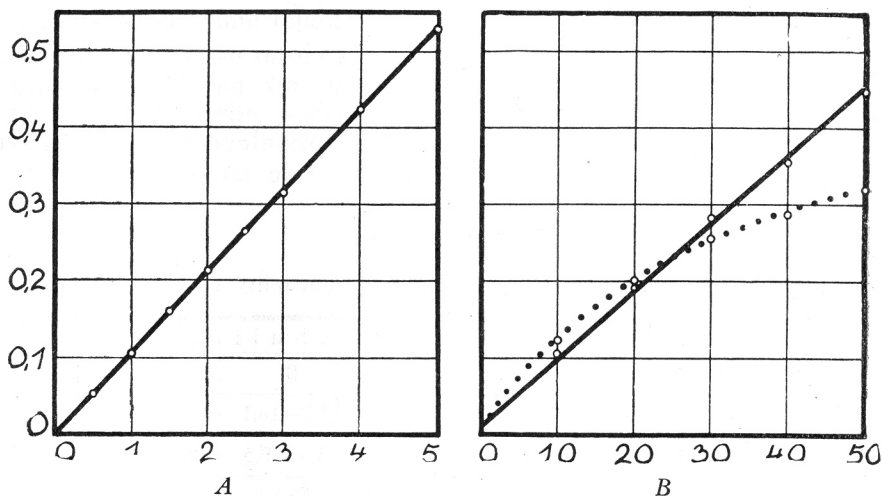
Osim opisanih načina ima i drugih metoda za kvantitativnu obradu elektroferograma. Tako Grassmann¹⁸) i drugi^{10, 22, 28}) fotometričaju boju na samom papiru, nakon što s tekućinom prikladnog indeksa loma učine papir u velikoj mjeri prozirnim. Wieland obrađuje trake svojom retenciografskom metodom⁵¹).

9. *Izgled elektroferograma.* Na gotovim elektroferogramima (v. sl. 3) razabiru se na svjetlo-plavoj pozadini pojedine više ili manje tamne pruge, koje potječu od pripadnih frakcija bjelančevina seruma. Ukupna duljina onog dijela trake, na kojem se nalazi frakcionirana bjelančevina, zavisi u prvom redu o trajanju elektroforeze i upotrebljenoj jakosti polja, te u većoj ili manjoj mjeri o raznim drugim faktorima (temperatura, kapilarno usisavanje pufera radi isparavanja, i t. d.). Ta duljina pod našim pokusnim uvjetima iznosi kojih 14 cm. Prva pruga od anodne strane trake u pravilu je (kod normalnog seruma) najintenzivnija, i pripada albuminima, a iza nje nižu se redom razne globulinske frakcije. γ -Globulini nalaze se redovito

katodno od ishodnog položaja, iako je pH upotrebljenog pufera (8,6) s alkalne strane njihove izoelektrične točke. To je posljedica elektro-osmoze, zbog koje su sve frakcije pomaknute par centimetara katodno.

REZULTATI VLASTITIH POKUSA

1. *Karakteristike boje amido-crnila.* Istraživači¹⁹⁾ koji upotrebljavaju amido-crnilo, ne eluiraju spomenutu boju, već je određuju densitometrijski, t. j. mjerenjem gustoće boje na samom papiru fotoelektričnim putem. Mi u pomanjkanju prikladnog densitometra boju eluiramo; stoga nam je trebalo odrediti i najpovoljnije uvjete za taj posao. Kod upotrebe Fisher-ova elektrofotometra pokazao se zeleni filter br. 525-B kao najprikladniji (v. sl. 2b). Ako se upotrebljava Pulfrich-ov »Stufenphotometer«, onda treba raditi filtrom S 61. Kao otopina za eluiranje najbolja je opisana 50% na



Sl. 2a) i b). Ovisnost ekstinkcije otopine amido-crnila 10 B o koncentraciji. Apscisa: a) koncentracija boje u povoljnim jedinicama; b) količina razrijeđenog seruma u mikrolitrama. Ordinata: specifična ekstinkcija ($E_{1\text{cm}}$). Fisher-ov elektrofotometar; izvučene krivulje: zeleni filter 525-B, točkasta krivulja: crveni filter 650-A.

Fig. 2a) and b). Optical density of the solution of »Amidoschwarz 10B« as a function of concentration of the dye. Abscissa: a) concentration of the dye in arbitrary units; b) volumes of diluted serum (1 pt. of serum + 4 pts. of buffer) in microliters. Ordinate: specific extinction ($E_{1\text{cm}}$). Fisher Electrophotometer; full lines: green filter 525-B, dotted line: red filter 650-A.

otopina metanola, zasićena natrijevim karbonatom. Stabilnost boje u eluatu veoma je velika; i nakon dva tjedna stajanja eluata na sobnoj temperaturi i danjoj rasvjeti, ekstinkcija takva eluata pala je jedva za 30%. Napokon smo istražili stupanj pokoravanja otopine amido-crnila Beer-ovu zakonu, što je pretpostavka za opisano jednostavno izračunavanje rezultata. Najprije smo jedan eluat veoma velike optičke gustoće, najveće koju smo uopće dobivali kod eluiranja traka, razrijeđivali otopinom za eluiranje, pa dobivene ekstinkcije namjerali kao ordinate prema razrijeđenjima kao apscisama (v. sl. 2a). Zatim smo na traku filter-papira, navlaženu puferom, stavili rastuće količine razrijeđenja seruma (1 ml seruma konja + 4 ml

pufera), traku osušili, obojili i t. d., t. j. postupili kao s elektroforetskom trakom. Pojedine smo mrlje eluirali, a pripadne ekstinkcije, korigirane prema σ ogledu (čisti papir), nanijeli na koordinatni sistem prema upotrebljenim količinama seruma (v. sl. 2b). Iz sl. 2b vidi se, da su dobivene ekstinkcije, kad se uzme u obzir razmjerna netočnost pipetiranja tako malih količina seruma, s dovoljnom točnošću linearno proporcionalne količini seruma. Iz slike se 2 a i b razabire da se amido-crnilo, otopljeno u našoj otopini za eluiranje, uz navedene eksperimentalne uvjete pokorava Beer-ovu zakonu, i da je prema tome dopušteno iz izmjerenih ekstinkcija eluata pojedinih proteinskih frakcija, opisanim jednostavnim računskim postupkom, računati relativni sastav bjelančevine u pripadnom serumu.

Elektroferogrami, obojeni amido-crnilom 10B, vrlo su stabilni prema svijetlu. Rezultat analize jednog elektroferograma, analiziranog nakon nekih 15 dana stajanja na difuznoj danjoj rasvjeti, nije se razlikovao od rezultata paralelnog elektroferograma, analiziranog odmah nakon bojenja; jedino se ukupna ekstinkcija (zbroy ekstinkcija svih frakcija) umanjila za kojih 10%.

2. *Reprodukciona vrijednost metode.* Da bismo ustanovili da li se rezultati daju dobro reproducirati, izvršili smo niz paralelnih pokusa. U tabeli 1 predočeni su rezultati elektroforetskog određivanja relativnog udjela pojedinih proteinskih frakcija seruma normalnog konja. U tu svrhu izvršeno je 16 elektroforetskih analiza jednog te istog seruma, i to 12

Tabela 1

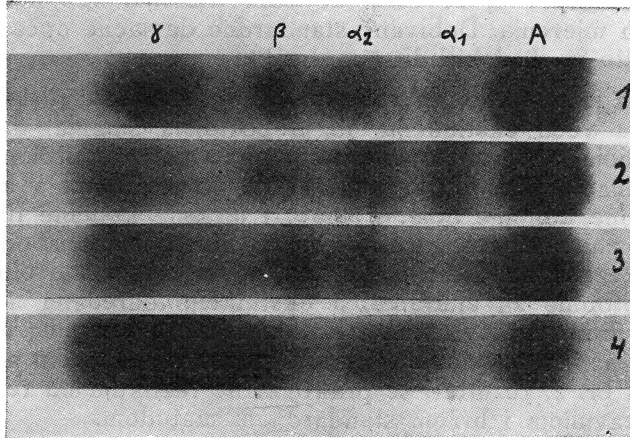
Reprodukciona vrijednost metode — Reproducibility of the method

| | | Albumini | G l o b u l i n i | | |
|---|---|----------------|-------------------|----------------|----------------|
| | | | α | β | γ |
| 1 | a | 42,9—44,2 | 14,0—15,6 | 14,1—16,1 | 25,6—27,4 |
| | b | 43,6 \pm 0,4 | 14,8 \pm 0,4 | 15,0 \pm 0,5 | 26,6 \pm 0,5 |
| 2 | | 43,8 | 14,6 | 15,1 | 26,5 |
| 3 | | 43,5 | 15,0 | 14,6 | 26,8 |

Rezultati elektroforetskih analiza istog seruma (normalan konj), navedeni u postocima ukupne bjelančevine. (Elektroferogram tog seruma vidi se pod 3 na sl. 3, a pripadni dijagram na sl. 4.) 1: rezultati dobiveni standardnom metodom (14 paralela); a: najmanja i najveća dobivena vrijednost; b: srednja vrijednost i standardna deviacija. 2: rezultati dobiveni iscrpnim eluiranjem pojedinih frakcija. 3: rezultati dobiveni integriranjem dijagrama na sl. 4. Percentage composition of the proteins of normal horse serum. 1: results obtained with the standard procedure (14 parallels); a: the range; b: the mean with the standard deviation. 2: results obtained by eluting each section of the strip 3 times successively and determining the optical density of the combined eluates. 3: results obtained by integrating the curve in fig. 4 in the usual manner.

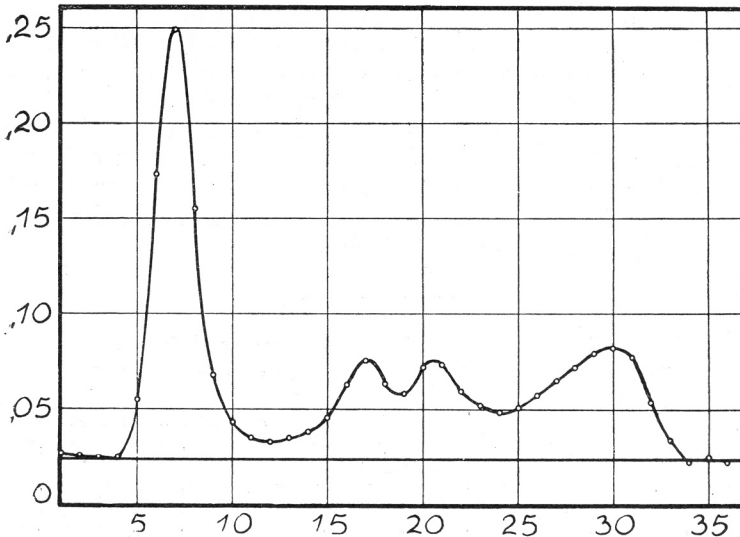
paralelnih analiza (dakle pod identičnim električkim i drugim uvjetima), a ostale 4 analize izvršene su pojedinačno u drugim zgodama istodobno s različitim drugim ogledima. Od spomenutih 12 paralelnih analiza, 6 ih je izvršeno posve jednako, primjenom već opisane standardne metode (širina trake 2 cm, 10 μ l seruma), a kod ostalih 6 mijenjani su neki uvjeti, i to širina trake (1 i 3 cm), i količina seruma (7 i 15 μ l). Usprkos tim promjenama svi su se rezultati dobro slagali. Od spomenutih 16 elektro-

ferograma 14 ih je obrađeno opisanom standardnom metodom. Rezultati tih 14 analiza prikazani su u tabeli pod 1. Pod a) naveden je variacioni interval (najmanja i najveća dobivena vrijednost), a pod b) navedena je



Sl. 3. Elektroferogrami četiriju različitih seruma. 1: normalan čovječji serum; 2: serum bolesnice (Hyperemesis gravidarum); 3: normalan konjski serum; 4: serum konja hiperimuniziranog protiv dizenterije.

Fig. 3. Electropherograms of four different sera. 1: normal human; 2: human, Hyperemesis gravidarum; 3: normal horse; 4: horse hyperimmunized against dysentery.



Sl. 4. Diagram normalnog konjskog seruma, dobiven rezanjem elektroferograma na 5 mm široke pruge, zatim eluiranjem s po 5 ml otopine za eluiranje i fotometriranjem dobivenih eluata. Apscisa: brojčane oznake pruga (udaljenosti od povoljnog ishodišta); ordinata: specifične ekstinkcije. Pripadni elektroferogram odnosno analitički rezultati vide se iz sl. 3 i tabele 2 pod br. 3. S istim serumom ustanovljena je i reprodukciona vrijednost metode (v. tabelu 1).

Fig. 4. Diagram of a normal horse serum, obtained with the alternative procedure (strip cut into 5 mm. sections). The corrected optical densities plotted against distance. The corresponding electropherogram and analytical results are shown under No. 3 in fig. 3 and table 2, respectively. With the same serum the reproducibility of the method was tested (table 1).

srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Standardna devijacija β -globulina i γ -globulina nešto je veća nego kod albumina i α -globulina, i to zato što je granica između β -globulina i γ -globulina manje oštra nego ostale 2 granice. Tu je stoga i nesigurnost rezanja malo veća, što se očituje u povišenoj standardnoj devijaciji dotičnih frakcija, kao mjeri disperzije odnosnog niza mjerenja. Dobivene standardne devijacije općenito su nešto manje, nego što su ih dobili drugi autori³⁹⁾.

Budući da je opaženo, da već eluirani dijelovi trake ostaju to tamniji, što eluat ima veću ekstinkciju, to je postojala sumnja, da ekstinkcija eluirane boje, zbog adsorpcije na papiru, nije proporcionalna količini boje vezane na dotični dio trake, već da stanovita mala količina boje, funkcija ukupne količine boje u eluatu i ukupne količine filter-papira u epruveti, zaostane vezana na filter-papir. Stoga je jedna od spomenutih 16 traka razrezana na dijelove, koji su zatim sukcesivno eluirani 3 puta s po 4 ml otopine za eluiranje, a ekstinkcija određena u sakupljenim eluatima pojedinih dijelova trake. Nakon takvog »iscrpnog eluiranja« svi dijelovi filter-papira zaostanu praktički posve bijeli. Kako se razabire iz tabele 1. pod br. 2, rezultati se praktički ne razlikuju od rezultata dobivenih jednostavnijom i bržom standardnom metodom.

Napokon, jedna od 16 traka razrezana je na jednake uske pruge od 5 mm širine. Pruge su numerirane, eluirane s po 5 ml otopine za eluiranje, a ekstinkcije nanese na ordinate prema bročanoj oznaci pruge na apscisi. Na taj način dobivena je sl. 4. Ako se na sl. 4 pojedine frakcije upotpune na Gauss-ove krivulje i integriraju, ili se, što je jednostavnije i kod papirne elektroforeze dopušteno, integriraju dijelovi krivulje između pojedinih minimuma, pa se tako dobivene površine izraze u postocima ukupne površine, dobivaju se vrijednosti (v. tablicu 1 br. 3), koje se veoma dobro slažu s vrijednostima dobivenim mnogo jednostavnijom standardnom metodom. Na temelju opisanih rezultata, kao i drugih koje posebno ne navodimo, zaključujemo, da je u eksperimentalnom dijelu opisana metoda u pravilu dovoljno točna za kvantitativnu obradu dobivenih elektroferograma, izuzevši pojedine, naročito patološke slučajeve, kad su granice između pojedinih frakcija sasvim nejasne.

Tabela 2

Rezultati analize četiriju seruma sa sl. 3.
Results of the analyses of the four sera from fig. 3.

| Broj seruma | Albumini | G l o b u l i n i | | | |
|-------------|----------|-------------------|------------|---------|----------|
| | | α_1 | α_2 | β | γ |
| 1 | 62,1 | 3,2 | 8,3 | 9,0 | 17,4 |
| 2 | 52,7 | 9,4 | 10,8 | 10,1 | 17,0 |
| 3 | 43,7 | 15,0 | | 14,7 | 26,6 |
| 4 | 23,2 | 16,8 | | 60,0 | |

Rezultati su navedeni u postocima ukupne bjelančevine. Brojčane oznake seruma kao na sl. 3.
The numbers of sera (in the first column) correspond to the numbers in fig. 3.

3. *Primjeri.* Za dopunsku dokumentaciju predočujemo i nekoliko slika elektroferograma raznih seruma, te analitičke rezultate odnosno jedan diagram, koji pripadaju tim elektroferogramima.*

ZAKLJUČAK

Na temelju prikazanih rezultata držimo, da nam je slobodno reći, da su kemija i različite njezine primijenjene grane, u prvom redu medicinska kemija, papirnom elektroforezom izvršno upotpunile svoje dosadašnje klasične elektroforetske postupke. Kažemo upotpunile, a ne nadomjestile zbog toga, što se već i na temelju dosadašnjeg zapravo početnog razvoja papirne elektroforeze može zaključiti, da ta metoda nije neka pojednostavnjena zamjena Tiselius-ove metode, nego je to metoda sui generis, veoma prikladna za skupinska istraživanja seruma i drugih proteinskih sistema. Budući da su fizikalno-kemijski uvjeti frakcioniranja bjelančevina kod obiju metoda različiti (homogeni i heterogeni sistem), a bitno su različita i svojstva bjelančevina, koja se upotrebljavaju za njihovu registraciju odnosno mjerenje (refrakcija odnosno vezanje boje), to se i rezultati dobiveni jednom i drugom metodom ne daju bez daljnega isporodivati. Općenito se drži, da je rezultate papirne elektroforeze najbolje usklađivati s rezultatima klasične elektroforeze s pomoću posebnih korekcija. No nakon što je pokazano²⁴), da potrebne korekcije znatno variraju, i u fiziološkim, a pogotovo u patološkim slučajevima, držimo, da će papirna elektroforeza trebati proći stanoviti svoj razvojni put, slično kao što ga je prošla i Tiselius-ova metoda. U prvom redu bit će potrebno dalje usavršavati i standardizirati samu metodiku, naročito u pogledu određivanja bjelančevina na elektroferogramima. No i najbolji način takvog određivanja ne će, vjerojatno, dati rezultate, koji bi se u svim slučajevima mogli podudarati s rezultatima slobodne elektroforeze. Stoga će biti potrebno primjenom tako usavršene metodike izvršiti velik broj istraživanja normalnih i patoloških seruma, dobiti tako normalne vrijednosti i njihove varijacije intervale, i na temelju obilja takvih podataka zaključivati o raznim patološkim pojavama.

Zaključno može se dakle reći, da je metoda papirne elektroforeze — jer je potrebna aparatura lako dostupna i skromnije uređenim zavodima, a rukovanje tom aparaturom veoma jednostavno, jer se sam rad vrši kod sobne temperature, jer se odjedamput može obraditi razmjerno velik broj seruma, jer otpada priprema seruma dijalizom i jer se s tom tipičnom

*) Elektroferogram vlastita seruma predočen na sl. 3 pod 1 dobiven je iz veoma male količine krvi na ovaj jednostavan način. Punkcijom prsta s Francke-ovom iglom dobiveno je oko 0,3—0,4 ml kapilarne krvi, koja je ostavljena u mikropruветi (visina 2 cm, unutarnji promjer 6 mm), da se zgruša i koagulum retrahira. Zatim je koagulum veoma oprezno sa staklenom iglom odlijepjen od stijenka epruветice, i centrifugiranjem 10—15 minuta kod 2000—3000 okr./min. sabijen na njeno dno. Iz sloja od cca 0,1 ml bistrog seruma iznad koagulumu lako se s pomoću prikladne mikropipete izvuče dovoljno seruma za nekoliko paralelnih ogleda. Iz ovog se primjera razabire, kako se s pomoću papirne elektroforeze u opisanoj izvedbi mogu istraživati serumj dobiveni iz veoma malih količina krvi, što može biti od važnosti pri radu u klinikama za dječje bolesti, pri radu s malim pokusnim životinjama, kao i uopće onda, kada se krvi ne može odnosno ne želi uzimati prečesto ili previše.

mikrometodom mogu istražiti serum i druge otopine i onda, kad se raspolaze samo veoma malim količinama takvih otopina — već i danas podesna za primjenu u biokemijskim i kliničkim laboratorijima, i da će sigurno i u budućnosti sve bolje i sve više služiti u istraživačkom radu, osobito u istraživanju raznolikih vrsta, stanja i promjena bjelancevina seruma.

Čast nam je i na ovom mjestu zahvaliti gg. profesorima K. Myrbäck-u, predstojniku Biokemijskog instituta u Stockholmu, i T. Wikén-u, predstojniku Instituta za mikrobiologiju i biologiju vrenja ETH u Zürichu, na darovanom filter-papiru i boji amido-crnilu, zatim doc. dr. B. Metzgeru, predstojniku Zavoda za fiziku Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, za posudbu sprava, te kolegi A. Cekcu, asistentu u Zavodu za stočarstvo Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, za izradu fotoreprodukcije.

ZAVOD ZA KEMIJU
VETERINARSKI FAKULTET
ZAGREB

Primljeno 28. svibnja 1952.

ABSTRACT

Electrophoresis of protein on filter paper. I.

A simple apparatus and technique of electrophoresis of serum proteins

by

N. ŠKARICA

A simple apparatus for the fractionation of serum proteins by electrophoresis on filter paper has been described. The apparatus is suitable for carrying out simultaneously a large number of electrophoretic analyses of serum or other fluids.

1. Apparatus and method. The apparatus (fig. 1) consists essentially of a wooden paraffined box, covered with two glass lids. In the box there are two glass cuvettes, each of which is subdivided by a vertical partition along its long axis into two compartments for the carbon or platinum electrodes and for the dipping ends of the strips of filter paper respectively. All of these compartments contain the buffer solution. The two compartments of a cuvette are connected with each other by means of a filter paper bridge, thus preventing the pH-changes from electrode compartments to reach the strips. The 2 cm. wide strips of Whatman No. 1 or 2 filter paper (up to 18 strips) are stretched horizontally across a support frame made of glass rods which fits into the box, the ends of the strips dipping into the respective compartments of the glass cuvettes. Suitable glass or lead weights, attached at the ends of the strips, hold the latter stretched.

The four compartments are filled with barbital-sodium-acetate-HCl buffer (pH = 8,6, $\mu = 0.1$), the frame is loaded with filter paper strips, inserted into the box, and the glass lids replaced. After the strips have become saturated by capillarity, the glass lids are separated a few cm., and through the slit between the lids 0,01 ml of the serum is applied to each strip, preferably at its center, in a narrow band 10 to 12 mm. long and perpendicular to the long axis of the strip. A well filtered direct current of about 150 v. and 0,5 m.a. per strip is maintained for a period of about 20—30 hours. The frame with the strips is then removed and put into an oven for 15 minutes at 105—110°C. The staining procedure is essentially that of Grassmann et al.¹⁹, with a saturated solution of »Amidoschwarz 10B« (Bayer-Werke, Leverkusen) in methanol containing 10% acetic acid as the staining reagent, and the same solution without the dye as the washing liquid. The strips are immersed for 30 minutes in the dye bath, and then washed free of the excess of the dye in 5 to 6 successive baths of washing liquid, the excess acetic acid etc. being removed by 1 or 2 quick washes in ether, after which the strips dry quickly. If a suitable densitometer^{19, 28} for reading the optical density of consecutive narrow sections of electropherograms

directly on the paper is not available (as it was not in our case), the strips are cut up into sections containing single protein fractions, one section free of protein being taken for correction for the dye adsorbed on the paper itself (blank). The lengths of the sections are measured (in mm.), and then the sections are eluted each with 6 ml. of 50% methanol saturated with sodium carbonate. After at least 2 to 3 hours or longer, the optical densities of the resulting solutions are read in a suitable photometer (e. g. Fisher Electrophotometer, filter No. 525-B). The optical densities are corrected for the blank, taking into account the length of each section, and the percentage composition of the sample calculated. Alternatively, the electropherogram can be cut up into 5 mm. sections, which are eluted with a smaller volume of the mentioned solution. In that way the well known electrophoretic diagrams, as in the classical Tiselius method, are obtained from which the percentage composition of the protein sample can be determined in the usual manner. This alternative procedure is more suitable for abnormal protein patterns.

2. *Discussion.* Some aspects of different techniques developed in the field of filter paper electrophoresis are discussed and our own experience presented.

3. *Results.* The applicability of Beer's law was tested, and it was found that under the experimental conditions described the optical density of solutions of »Amidoschwarz 10B« was directly proportional to the concentration of the dye (fig. 2). If two electropherograms of the same protein solution are analyzed according to the standard technique and alternative procedure described above, respectively, the results agree within the experimental error. Statistical analysis of parallel determinations shows that the reproducibility of the method is good (table 1).

CHEMICAL INSTITUTE
VETERINARY FACULTY
ZÁGREB, CROATIA

[Received, May 28, 1952]

LITERATURA

1. Bachrach, H. L., *Am. J. Vet. Res.*, **13** (1952) 17.
2. Berkeš, I., *Liječn. vjesnik*, **73** (1951) 75.
3. Brattsten, I. i Nilsson, A., *Arkiv Kemi*, **3** (1951) 337.
4. Bücher, T., Matzelt, D. i Pette D., *Naturwiss.*, **39** (1952) 114.
5. Cremer, H. D. i Tiselius, A., *Biochem. Z.*, **320** (1950) 273.
6. Durrum, E. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **72** (1950) 2943.
7. Durrum, E. L., *Science*, **113** (1951) 66.
8. Durrum, E. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **73** (1951) 4875.
9. Durrum, E. L., *J. Colloid Sci.*, **6** (1951) 274.
10. Eisenreich, F. i Eder, M., *Klin. Wschr.*, **29** (1951) 60.
11. Emmrich, R., *Dtsch. Gesundheitswes.*, **6** (1951) 585.
12. Flynn, F. V. i DeMayo, P., *Lancet*, **261** (1951) 235.
13. Ganzin, M. i Macheboeuf, M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34** (1952) 32.
14. Ganzin, M., Macheboeuf, M. i Rebeyrotte, P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34** (1952) 26.
15. Gállespie, J. M., Jermyn, M. A. i Woods, E. F., *Nature*, **169** (1952) 487.
16. Gordon, A. H., Gross, J., O'Connor, D. i Pitt-Rivers, R., *Nature*, **169** (1952) 19.
17. Grassmann, W., *Naturwiss.*, **38** (1951) 200.
18. Grassmann, W. i Hannig, K., *Naturwiss.*, **37** (1950) 496.
19. Grassmann, W., Hannig, K. i Knedel, M., *Dtsch. Med. Wschr.*, **76** (1951) 333.
20. Hugentobler, F., Wunderly, Ch. i Schneider, G., *Klin. Wschr.*, **29** (1951) 705.
21. Kirk, P. L. i Duggan, E. L., *Anal. Chem.*, **24** (1952) 124.
22. Knedel, M., *Med. Monatsschr.*, **5** (1951) 707.
23. Körver, G., *Klin. Wschr.*, **28** (1950) 693.
24. Koiw, E., Wallenius, G. i Grönwall, A., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33** (1951) 1940.
25. Kunkel, H. G. i Tiselius, A., *J. Gen. Physiol.*, **35** (1951) 89; cit. prema 21.

26. Kutzim, H., *Naturwiss.*, **39** (1952) 135.
27. Latner, A. L., *Biochem. J.*, **51** (1952) XII.
28. Latner, A. L., Braithwaite, F. i Nunn, R. A., *Biochem. J.*, **51** (1952) X.
29. Lederer, M., *Research*, **4** (1951) 371.
30. Longworth, L. G., *Chem. Revs.*, **30** (1942) 323.
31. McDonald, H. J. i Marbach, E. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **74** (1952) 1619.
32. McDonald, H. J., Urbin, M. C. i Williamson, M. B., *Federation Proc.*, **10** (1951) 218.
33. McDonald, H. J., Urbin, M. C. i Williamson, M. B., *J. Colloid Sci.*, **6** (1951) 236.
34. Macheboeuf, M., Rebeyrotte, P. i Brunerie, M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33** (1951) 1543.
35. Mahkota, S. i Dolar, P., *Zdravstv. vestnik (Ljubljana)*, **21** (1952) 60.
36. Michl, H., *Monatsh. Chem.*, **82** (1951) 489.
37. Michl, H., Riedl, K. i Wessely F., *Monatsh. Chem.*, **82** (1951) 539.
38. Mills, G. T. i Smith, E. E. B., *Biochem. J.*, **49** (1951) VI.
39. Plückthun, H. i Götting, H., *Klin. Wschr.*, **29** (1951) 415.
40. Schüld, K. T. i Maurer, W., *Naturwiss.*, **38** (1951) 303.
41. Schmid, L., Michl, H. i Zwettler, G., *Monatsh. Chem.*, **82** (1951) 526.
42. Schneider, G., *Acta Chem. Scand.*, **5** (1951) 1020.
43. Schneider, G. i Wallenius, G., *Scand. J. Lab. Clin. Invest.*, **3** (1951) 140.
44. Schneider, G. i Wunderly, Ch., *Schweiz. med. Wschr.*, **82** (1952) 445.
45. Schwarz, V., *Nature*, **167** (1951) 404.
46. Strain, H. H. i Murphy, G. W., *Anal. Chem.*, **24** (1952) 50.
47. Strain, H. H. i Sullivan, J. C., *Anal. Chem.*, **23** (1951) 816.
48. Tiselius, A., *Naturwiss.*, **37** (1950) 25; *Rendiconti inst. super. sanità*, **13** (1951) 916.
49. Turba, F. i Enenkel, H. J., *Naturwiss.*, **37** (1950) 93.
50. Wallenfels, K. i Pechmann, E. v., *Angew. Chem.*, **63** (1951) 44.
51. Wieland, T. i Wörth, L., *Angew. Chem.*, **62** (1950) 473; *ibid.*, **63** (1951) 171.
52. Witmer, R., *Exper.*, **7** (1951) 347.