

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 23, 1985, pp. 411–419

## Durchfluß-Elektrophorese

Von A. Kinawi und A. Hecker

*Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin*

(Eingegangen am 26. November 1984/17. Januar 1985)

**Zusammenfassung:** Die Konstruktion sowie die wichtigsten technischen Einzelheiten und die Handhabung eines neuen Elektrophorese-Gerätes<sup>1)</sup> werden hier angegeben. Das Gerät ermöglicht in einfacher Weise die Durchführung der Durchfluß-Elektrophorese sowie fast sämtlicher Elektrophorese-Techniken in Flach- und Rundgelen. Die Anwendbarkeit dieser Apparatur wird anhand einiger Trennungen, die mit Hilfe der Durchfluß-Elektrophorese ausgeführt wurden, gezeigt.

### *Flow-through electrophoresis*

**Summary:** The construction, the main technical details and the handling of a new electrophoretic apparatus<sup>1)</sup> are described. This system can be used for flow-through electrophoresis, as well as all slab or tube gel techniques. The suitability of the apparatus is demonstrated by the electrophoretic analysis of different samples by flow-through electrophoresis.

### **Einführung**

Die weite Anwendung der Elektrophorese als analytisches und präparatives Verfahren beruht auf der hohen Flexibilität, Kapazität und Trennleistung dieses Systems (1–3). Für die Flexibilität des Verfahrens sprechen die unterschiedlichen Ausführungsformen (Disc-Elektrophorese, Isotachophorese, Elektrofokussierung, zweidimensionale Elektrophorese . . .). Es hat hierbei nicht an Versuchen gefehlt, das Trägermaterial, meistens Polyacrylamidgel, in Anlehnung an die Säulenchromatographie als stationäre Phase zu verwenden (Durchfluß-Elektrophorese). Hierbei werden die Banden unmittelbar nach Verlassen der „Gelsäule“ von einem ständig fließenden Spülpuffer aus dem elektromagnetischen Feld entfernt (2). Der aus dem „Chromatographischen System“ austretende Spülpuffer wird in Fraktionen gesammelt bzw. unmittelbar durch einen Detektor geschickt (4–6). Dieses Verfahren wurde früher als Elutions-Elektrophorese bekannt (2) und führt heute unter anderem (in Anlehnung an die HPLC) die Bezeichnung „High Performance Electrophoresis“, HPE (7).

Die direkte Übertragung von allgemein gültigen Erfahrungen auf dem Gebiet der Elektrophorese ohne ausreichende Anpassung an dieses Verfahren (z. B. Gel-Zusammensetzung und -länge) sowie eine Reihe von ungelösten technischen Schwierigkeiten (z. B. Kanalbildung und Wärmeabfuhr) haben dazu beigetragen, daß unter der Vielfalt von elektrophoretischen Verfahren dieses weitgehend unbekannt und die enorme Trennleistung dieses Systems ungenutzt blieb.

Aufgrund einer neuen Konstruktion, die einen intensiven Wärmeaustausch ermöglicht, ist es gelungen, eine der beiden Hauptschwierigkeiten, nämlich die Überhitzung des Gels, zu beseitigen. Das zweite Problem bei diesem Verfahren bestand in der Ausbildung des Kanals für den strömenden Spülpuffer. Dieses Problem wurde bei den auf dem Markt erhältlichen Geräten mit Hilfe einer Membran und mehrerer Dichtungen, die in einen Rahmen eingebettet sind, gelöst. Diese nicht optimale Lösung stellt die Achillesferse des Verfahrens dar, denn die Membran, die mehrfachen Dichtungen und der Rahmen wirken wärmedämmend. Dies führt bei gleichzeitig unzureichender Kühlung zu örtlicher Erwärmung, wodurch

<sup>1)</sup> Fa. Ernst Schütt jr., Göttingen.

sich unter Umständen Gelteile im Spülpuffer lösen („Gelpeak“). Weiterhin verdeckt der Rahmen das Gel-Ende, so daß eine Beurteilung des Zustandes des Gels in seiner gesamten Länge nicht möglich ist.

Mit Hilfe einer einfachen Gel-Gieß-Technik (siehe unten) wurden die oben erwähnten Probleme beseitigt. Hiernach bildet sich der Spülpuffer-Kanal zwischen dem Trenn- und einem sogenannten Verschuß-Gel, was einen optimalen Wärmeaustausch bei Gewährleistung des Sichtkontaktes ermöglicht.

Somit ist ein Gerät entstanden, das nach dem heutigen Stand der Technik optimale Bedingungen für die Durchführung dieses Verfahrens anbietet.

Um die Nutzung dieser Apparatur nicht nur auf die Durchführung von Durchfluß-Elektrophorese zu begrenzen, wurde die Konstruktion so ausgelegt, daß die Durchführung fast sämtlicher Elektrophorese-Verfahren möglich ist (siehe unten).

Diese Arbeit befaßt sich mit der Beschreibung, Handhabung und den Einsatzmöglichkeiten dieses Gerätes und zeigt anhand einiger Trennungen die Leistungsfähigkeit des Systems.

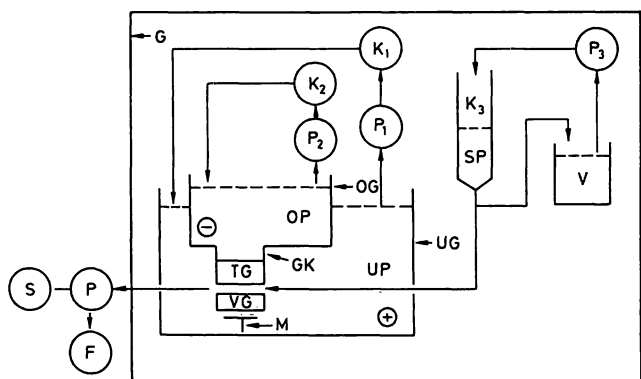


Abb. 1. Schematische Darstellung des Gerätes.

G	= Grundgerät
TG	= Trenngel
VG	= Verschußgel
M	= Magnetrührer
GK	= Gelkassette
OP	= Oberpuffer
UP	= Unterpuffer
OG	= Oberes Gefäß
UG	= Unteres Gefäß
K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>3</sub>	= Intensivkühler
P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub>	= Magnetpumpen (Umwälzpumpen)
P <sub>3</sub>	= Schlauchpumpe
V	= Vorratsgefäß für Spülpuffer
SP	= Spülpuffer
P	= Photometer
F	= Faktionssammler
S	= Schreiber

## Beschreibung des Gerätes

Das Prinzip dieses Verfahrens ist oben besprochen worden. Hier sollen die wesentlichen technischen Einzelheiten anhand der Abbildung 1 erläutert werden. Der Übersichtlichkeit halber wird die Beschreibung des Gerätes in drei Abschnitte unterteilt.

### Das Grundgerät

Dies stellt ein Gehäuse dar, welches je nach Art des Vorhabens die entsprechenden Bauelemente aufnimmt und im laufenden Betrieb (geschlossener Stromkreis) den Zugang zu den Elektroden und zum Puffer verhindert. Im Grundgerät sind ein Magnetrührer, die beiden Pumpen (P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub>) sowie die erforderlichen elektronischen Bauelemente fest installiert. Diese Teile befinden sich unter einem Zwischenboden und sind von außen nicht sichtbar. An den Innenwänden des Gehäuses sind die Anschluß-Buchsen für die Elektroden sowie zwei große Intensiv-Kühler (K<sub>1</sub> und K<sub>2</sub>) und ein einfacher Kühler (K<sub>3</sub>) befestigt. Die Ausgänge von P<sub>1</sub> bzw. P<sub>2</sub> sind durch Silikonschläuche mit den Eingängen von K<sub>1</sub> bzw. K<sub>2</sub> verbunden. Um die Fließgeschwindigkeit des Spülpuffers konstant zu halten, ist der Ausgang von K<sub>3</sub> über ein T-Stück und einen Silikonschlauch mit einer in der Höhe verstellbaren Überlaufvorrichtung verbunden. Eine Schlauchpumpe befördert den Spülpuffer aus dem Vorratsgefäß in K<sub>3</sub>, der Überlauf tropft in das Vorratsgefäß zurück.

Das Grundgerät soll bei allen Arbeiten mit dieser Apparatur verwendet werden, da es die erforderliche technische Sicherheit (Mikroschalter) bietet und außerdem eine intensive Kühlung ermöglicht.

### Bauteile für die Durchfluß-Elektrophorese

Die Durchfluß-Elektrophorese läßt sich mit Flach- und Rundgelen durchführen. Erfahrungsgemäß soll die Gelstärke 4 mm nicht übersteigen. Aus diesem Grund sind Flachgel-Kassetten für Gelstärken von 1, 2 und 4 mm entwickelt worden (Abb. 2). Dasselbe gilt für „Säulenverschlüsse“ von Rundgelen (Abb. 3). Die Gellänge läßt sich bis zu 200 mm variieren. Somit sind für die Durchführung der Durchfluß-Elektrophorese folgende Bauteile erforderlich:

- das untere Gefäß „UG“ (Abb. 1)
- das spezielle obere Gefäß „OG“ (Abb. 1)
- mindestens eine Flachgel-Kassette (Abb. 2) oder
- eine Rundgelhalterung mit dem entsprechenden Säulenverschluß (Abb. 3).

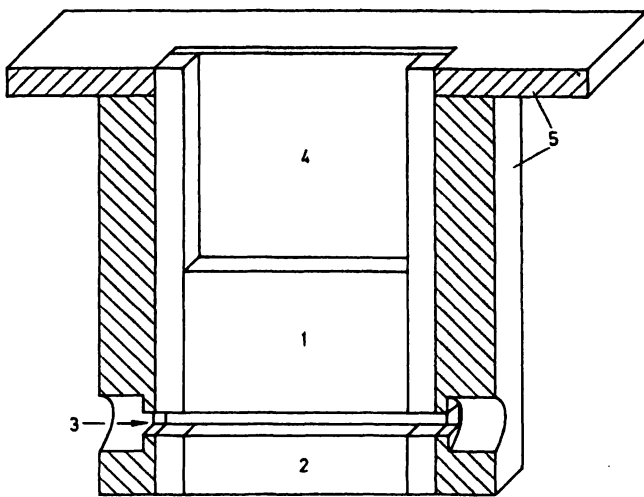


Abb. 2. Längsschnitt durch eine Flachgelkassette an der Innenebene der zweiten Glasplatte.  
1 = Trenngel, 2 = Verschlussgel, 3 = Kanal, 4 = Glasplatte, 5 = Befestigungsrahmen.

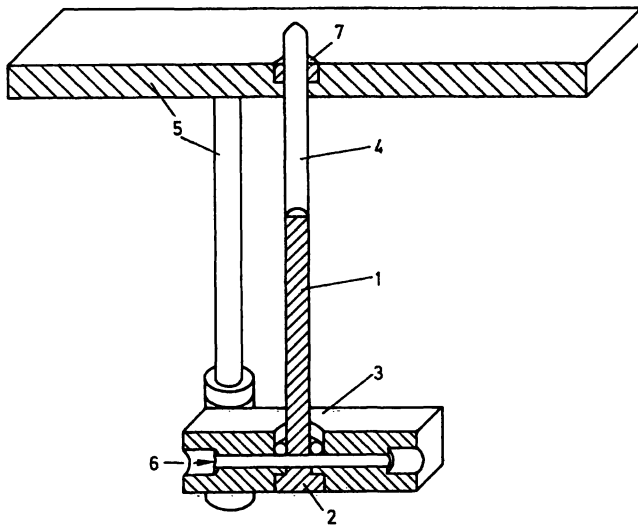


Abb. 3. Vorrichtung zur Durchführung der Durchfluß-Elektrophorese in Rundgelen.  
1 = Trenngel, 2 = Verschlussgel, 3 = Säulenschluß, 4 = Glasrohr, 5 = Befestigungselemente, 6 = Kanal, 7 = Dichtung.

### Sonstige Bauteile

Wie schon oben erwähnt, soll sich die Anwendung dieser Apparatur nicht nur auf die Durchführung der Durchfluß-Elektrophorese beschränken. Daher sind eine Reihe von Zusatzteilen entwickelt worden, die folgende Arbeitstechniken ermöglichen.

#### Einsatz von Rundgelen (siehe Abb. 3)

Dieses Bauteil ermöglicht den Einsatz von Rundgelen (maximal 30).

Geldurchmesser: 0.5–5.0 mm  
Gellänge: bis 200 mm

#### Einsatz von Flachgelen in senkrechter Technik (siehe Abb. 4)

Gelstärke: 0.5–8.0 mm  
Gelbreite: 30–140 mm  
Gellänge: bis 200 mm

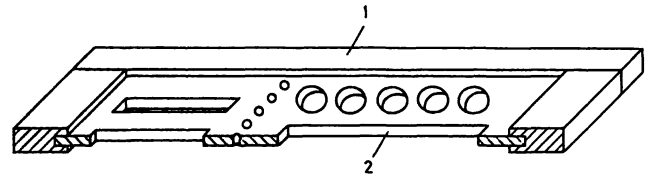


Abb. 4. Bauelement zur Durchführung der Elektrophorese in Rund- und Flachgelen.  
1 = Befestigungsrahmen, 2 = Silikonscheibe mit unterschiedlichen Schlitz- und Bohrgrößen.

#### Einsatz von Flachgelen in waagerechter Technik (ohne Abb.)

Gelabmessungen: 1 oder 2 mm × 200 mm × 200 mm

### Handhabung

Die Erläuterung der Handhabung beschränkt sich hier auf die Durchführung der Durchfluß-Elektrophorese mit Flach- und Rundgelen, da die anderen Arbeitstechniken bei der Durchführung der einfachen Elektrophorese, Disc-, SDS-, zweidimensionaler Elektrophorese oder Elektrofokussierung auf Rund- bzw. Flachgelen keine wesentlichen Veränderungen erfordern.

#### Gießen von Trenn- und Verschlussgel (Kanalbildung)

Durch die beiden Öffnungen der Flachgel-Kassette (Abb. 2) wird ein Silikongummistreifen gezogen. Hierdurch wird die Kassette in zwei voneinander wasserdicht getrennt Räume unterteilt. Anschließend werden etwa 200 µl H<sub>2</sub>O in die Kassette gefüllt und diese in senkrechter Stellung mit dem vorgesehenen Volumen der verwendeten Gellösung unterschichtet (Abb. 2). Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wird die wäßrige Phase über dem Gel entfernt, die Gelfront mit etwa 0,5 ml H<sub>2</sub>O gespült und danach das Verschlussgel im unteren Raum der Kassette gegossen. Nach Beendigung der Polymerisation des Verschlussgels wird der Silikongummistreifen entfernt. Die so behandelte Kassette wird anschließend in dem oberen Gefäß (Abb. 1) befestigt und mit den Anschlüssen für den Durchfluß des Spülpuffers versehen. Die Vorrichtung wird dann in das mit Puffer gefüllte untere Gefäß (Abb. 1) gestellt und der Ausgang des Kanals mit dem Detektor verbunden. Hierbei muß darauf geachtet werden, daß sich im Kanal keine Luftblasen befinden. Danach wird das obere Gefäß mit Puffer gefüllt und

die Eingänge der Pumpen sowie die Ausgänge der Intensivkühler werden an die entsprechenden Anschlüsse am oberen bzw. unteren Gefäß angeschlossen. Mit Hilfe eines angeschlossenen Kryostaten läßt man das System bei eingeschaltetem Rührer und Pumpen auf die gewünschte Temperatur abkühlen. Frisch gegossene Trenngelle müssen vor ihrer Verwendung zuerst vorelektrophoretisiert werden (Präelektrophorese), um Verunreinigungen (Acrylsäure und niedermolekulare Polymerisate) zu entfernen. Bei Verwendung von Rund-Gelen wird das mit Gel gefüllte Glasrohr in der Halterung mit Säulenverschluß (Abb. 3) befestigt. Das Gießen des Verschlußgels erfolgt hier nach dem Einziehen eines Silikon-Schlauches in den Pufferkanal, ansonsten wird wie oben beschrieben verfahren.

Zum Entleeren bzw. Reinigen des Gerätes werden die beiden aus der Rückwand des Gehäuses heraustretenden Silikonschläuche geöffnet.

Diese Schläuche sind über je ein T-Stück mit Pumpe und Kühler verbunden und müssen nach Reinigung bzw. Pufferwechsel verschlossen bleiben.

### Besondere Einsatzmöglichkeiten

Neben den oben erwähnten Einsatzmöglichkeiten erlaubt diese Apparatur die Durchführung folgender Arbeitsvorgänge:

### Konzentrieren von Proben

Hierfür wird eine lange Flachgellkassette benutzt, die mit einem 8–10 mm hohen „Trenngel“ versehen ist. Das Probenvolumen beträgt hierbei 3–5 ml. Bei richtiger Wahl von Stromstärke, Gelzusammensetzung und Fließgeschwindigkeit des Spülpuffers ist das Retentionsvolumen der Probe kleiner als das aufgetragene Probenvolumen. Dieser Vorgang läßt sich mehrmals wiederholen.

### Umpuffern

Dies verläuft ähnlich wie bei der Gelfiltration, mit dem Unterschied, daß die Pufferionen der Probe vor der Probe das System verlassen. Die Probe erscheint in dem verwendeten Elektrophorese-Puffer.

### Elektro-Ultrafiltration

Durch die Wahl geeigneter Porengröße und Länge des Trenngels lassen sich die niedermolekularen Stoffe eines Gemisches voneinander trennen, während die hochmolekularen Stoffe des Gemisches auf dem Trenngel bzw. im weicheren Sammelgel zurückbleiben. Dies hat den Vorteil einer kürzeren Analysendauer, da die meist langsam wandernden hochmolekularen Stoffe die Analyse nicht stören.

## Zweidimensionale Elektrophorese

Die zweidimensionale Elektrophorese in der gewöhnlichen Ausführung läßt sich, wie oben erwähnt, mit diesem Gerät durchführen. Wird jedoch nach der ersten Dimension elektrofokussiert und die Gelsäule nach Maßgabe der gefärbten Banden in Scheiben geschnitten, so lassen sich die Inhalte der einzelnen Scheiben in der zweiten Dimension über geeignete Gele mit Hilfe der Durchfluß-Elektrophorese weiter trennen.

### Trennbeispiele

Aus den durchgeführten Arbeiten sollen hier folgende Trennungen gezeigt werden:

- Analysen-Nr. 1: ADP/AMP (Abb. 5)  
 2: NADPH/NADP/NADH/NAD (Abb. 6)  
 3: Insulin Kette A/Insulin Kette B (Rind) (Abb. 7)  
 4: Insulin Kette A (Rind)/Humanserumalbumin/Ferritin (Pferd) (Abb. 8)  
 5: Peptide Glycyl-Glycin/Alanyl-Glycin/Leucyl-Glycyl-Glycin (Abb. 9)  
 6: Schlangengift von *Crotalus atrox* (Abb. 10)  
 7: Humanserum (Abb. 11)

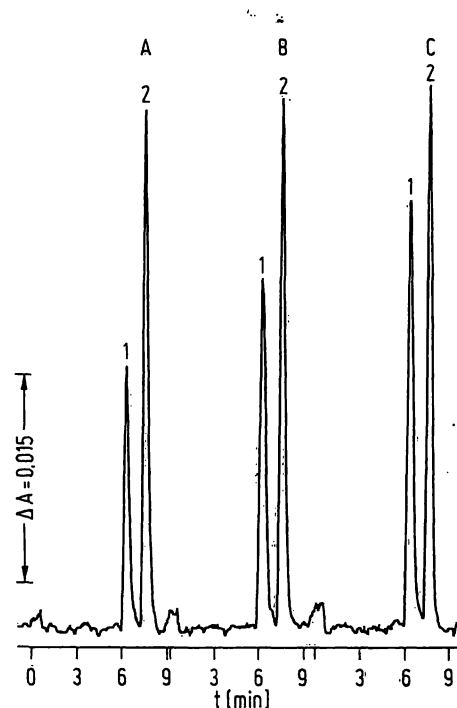


Abb. 5. Chromatogramme von 3 Analysenproben A, B und C. 1 = ADP, 2 = AMP (siehe Abb. 12).

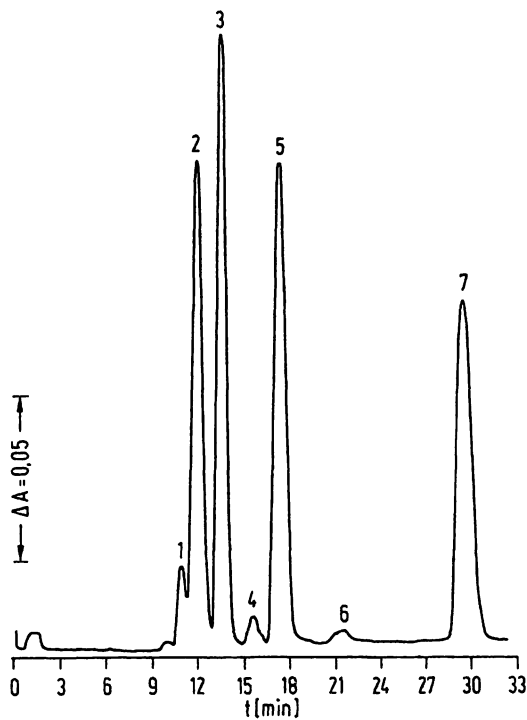


Abb. 6. Chromatogramm der Trennung von Pyridinnucleotiden: NADPH (=2), NADP (=3), NADH (=5), NAD (=7); 1, 4 und 6 = Verunreinigungen.

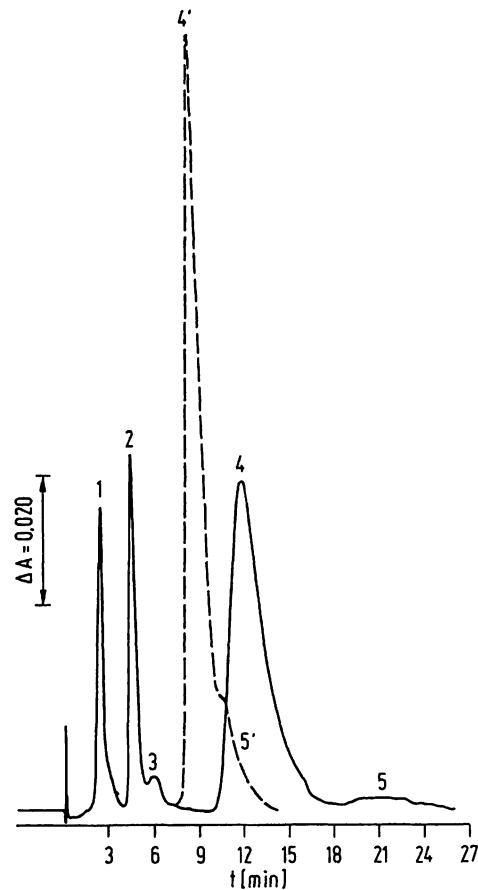


Abb. 8. Chromatogramm der Trennung von Insulinkette A (= 1), Humanserumalbumin (=2), Ferritin (=4); 3 und 5 sind Verunreinigungen. Die gestrichelte Peaks 4' und 5' zeigen den Analysenverlauf, wenn 6 Minuten nach Analysenbeginn die Stromstärke von 15 mA auf 50 mA erhöht wird.

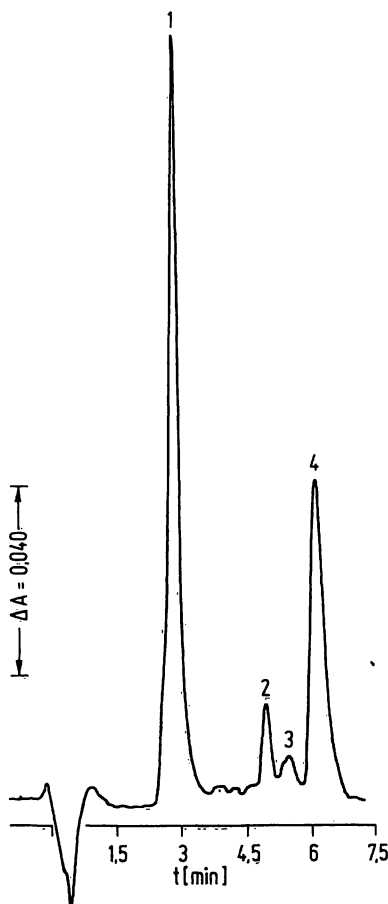


Abb. 7. Chromatogramm der Trennung von Kette A (=1) und Kette B (=4) von Rinderinsulin, 2 und 3 = Verunreinigungen aus Kette B.

Bei allen diesen Trennungen wurde ein einheitlicher Puffer sowohl als Elektroden- als auch als Spülpuffer verwendet: 20 mmol/l Tris/Glycin-Puffer pH 8.3.

Für die Herstellung der Trenn- und Verschlussgele wurden folgende wäßrige Stammlösungen verwendet:

Acrylamid 500 g/l	(Lösung A)
Bisacrylamid 26 g/l	(Lösung B)
Tetramethyldiamin (TEMED) 6 g/l	(Lösung C)
Gelpuffer (Tris/HCl; pH 8,9)	(Lösung D)
Ammoniumperoxodisulfat	(Lösung E)

Die übrigen „chromatographischen Bedingungen“ sind den entsprechenden Legenden sowie Tabelle 1 zu entnehmen.

Für die Analysen Nr. 6 und 7 wurde ein zusammengesetztes Trenngel verwendet. Dabei wurde das härtere Gel (100 g/l) zuerst gegossen. Für alle Analysen wurde ein Verschlussgel in Tabelle 1 angegebenen Zusammensetzung verwendet.

Um die Reproduzierbarkeit des Systems zu zeigen und die mehrfache Verwendbarkeit ein und desselben Gels (5 bis 20 mal) zu demonstrieren, wurde mit Hilfe einer AMP-Lösung (67,5 mg/l) eine ADP-Verdünnungsreihe hergestellt. Die ermittelten Quotienten ADP-Peakhöhe/AMP-Peakhöhe der einzelnen Proben wurde gegen die entsprechenden ADP-Konzentrationen aufgetragen. Die so ermittelte ADP-Standardgerade zeigt Abbildung 12.

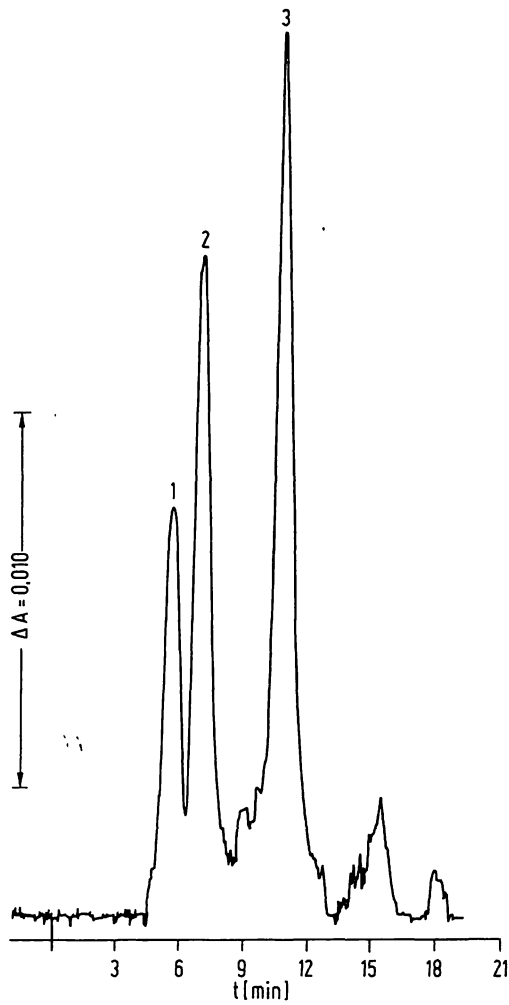


Abb. 9. Chromatogramm der Trennung von Gly-Gly (=1), Ala-Gly (=2), Leu-Gly-Gly (=3), nicht numerierte Peaks = Verunreinigungen.

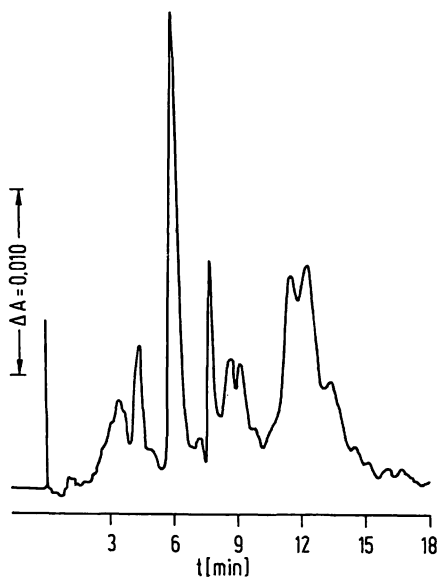


Abb. 10. Chromatogramm der Analyse von Schlangengift (*Crotalus atrox*).

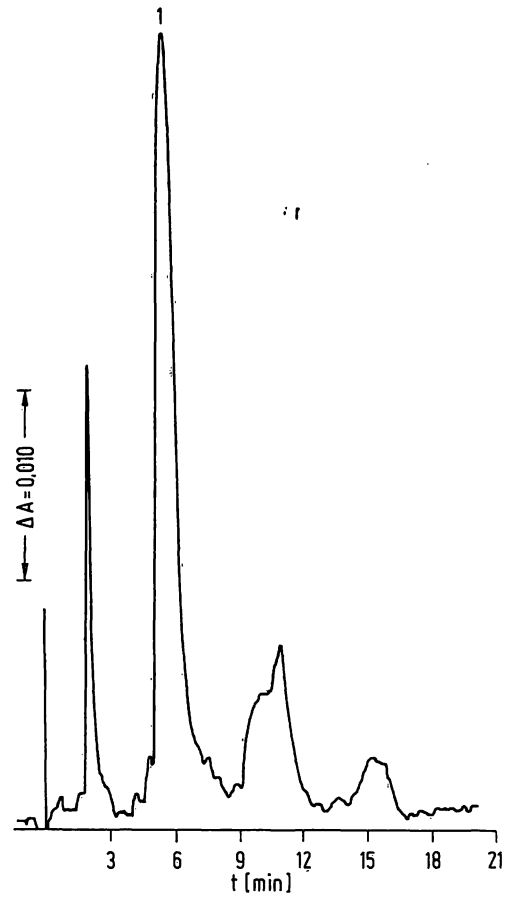


Abb. 11. Chromatogramm der Analyse von Humanserum. 1 = Albumin, andere Peaks nicht identifiziert.

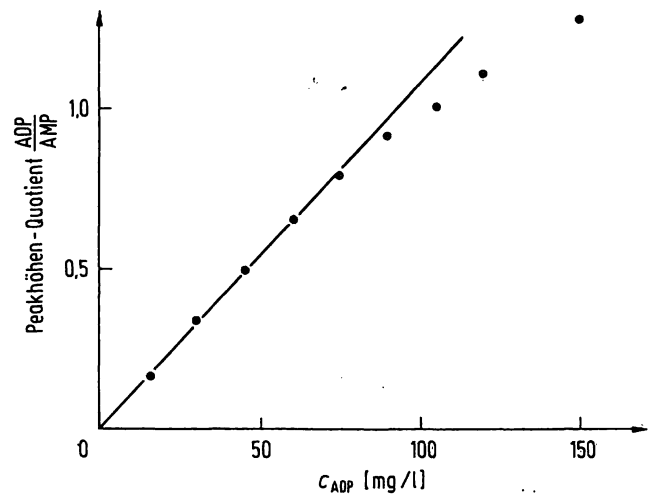


Abb. 12. ADP-Standard-Gerade.

### Herkunft der verwendeten Chemikalien

Die Ketten A und B des Rinderinsulins sowie Humanserumalbumin wurden von der Firma Boehringer, Mannheim, Glycin von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Das verwendete Humanserum stammte von einem freiwilligen Spender, alle weiteren Chemikalien von der Firma Serva, Heidelberg.

Tab. 1. Experimentelle Bedingungen für die Trennbeispiele.

Analysen-Nr.	Zusammensetzung des Trenngels (ml Lösung:)					Gel-länge (mm)	Fließ-geschw. (ml/h)	$\lambda$ (nm)	Strom-stärke (mA)	Konzentration der Komponenten (g/l)	Analysen-probe ( $\mu$ l)	
	A	B	C	D	E							
1	0,40	0,04	0,15	0,05	1,36	80	75	260	20	AMP: = 0,675; ADP: 0,015–0,150	10	
2	0,40	0,03	0,15	0,05	1,47	75	80	260	20	NADPH: 1,16; NADP: 1,16; NAD: 1,08; NADH: 1,18	10	
3	0,30	0,03	0,15	0,05	1,37	24	80	220	20	Insulin Kette A: 0,9583; Kette B: 0,75	10	
4	0,30	0,04	0,15	0,05	1,46	6	60	280	15 15/50	HSA: 5,0; Ferritin: 2,5; Insulin Kette A: 2,5	15	
5	0,40	0,04	0,15	0,05	1,36	83	100	220	20	Gly-Gly: 2,0; Ala-Gly: 2,066; Leu-Gly-Gly: 2,12	30	
6	0,30	0,03	0,15	0,05	1,47	6	12	70	280	10	Schlangengift: 10	10
	0,40	0,04	0,15	0,05	1,36	+6						
7	0,30	0,03	0,15	0,05	1,37	5	9	60	280	10	50 $\mu$ l Serum + 300 $\mu$ l Puffer	20
	0,40	0,04	0,15	0,05	1,36	+4						
Zusammensetzung des Verschußgels												
	0,30	0,10	0,10	0,05	0,70							

### Vorteile des Systems

1. Die wesentlichen Vorteile der Durchflußelektrophorese liegen auf der Hand. Unmittelbar nach Beendigung der Analyse, die unter Umständen nur wenige Minuten dauert, liegen die getrennten Stoffe (z. B. Proteine) in geeigneter Form für weitere Arbeiten vor.

Hierdurch entfallen die Arbeitsgänge Fixieren, Färben, Entfärben, Ausscheiden, Extrahieren und Entfernen des Farbstoffes aus der Probe. Diese Arbeitsgänge nehmen Zeit in Anspruch und beeinträchtigen in vielen Fällen die biologische Aktivität.

2. Im Vergleich zu anderen Elektrophorese-Verfahren läßt sich hier das Trenngel mehrfach verwenden.

3. Niedrigere Kosten des Trenngels

4. pH-Gradienten-Bildung ohne Ampholine, lediglich durch Unterschiede im pH des Ober- und Unterpuffers

5. Die Verwendbarkeit des Gerätes für mehrere Elektrophorese-Verfahren.

### Betrachtung des Trenngels als stationäre Phase

Die Elektrophorese wurde schon 1953 von *T. Wieland* und *F. Turba* (8) als chromatographisches Verfahren betrachtet. Gegen diese Betrachtungsweise spricht jedoch das Fehlen der mobilen Phase. Weiterhin ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, daß die Feldstärke, die Nettoladung der zu trennenden Moleküle und ihre Molgröße bei der elektrophoretischen Trennung die maßgeblichen Kenngrößen sind.

Die mehrfache Verwendbarkeit des Trenngels, die Reproduzierbarkeit des Systems und die Symmetrie der Chromatogramme erlauben jedoch die Betrachtung des Trenngels als stationäre Phase, so daß hier — wenn auch nur in formaler Hinsicht — ein Vergleich der Trennleistung dieses Systems mit anderen chromatographischen Systemen möglich ist. So lassen sich hier anhand erhaltener Chromatogramme die entsprechenden Bodenzahlen  $n$  nach der Gleichung  $n = 16 (t_R/W)^2$  ermitteln (9), dabei ist  $n$  = Bodenzahl,  $t_R$  = Retentionszeit,  $W$  = Basisbreite.

## Diskussion

Während für die einzelnen Elektrophorese-Verfahren eine zutreffende, das entsprechende Verfahren gut beschreibende Bezeichnung gefunden wurde, ließ sich für das hier besprochene Verfahren — obwohl es vom Prinzip her seit längerem bekannt ist — keine zufriedenstellende Bezeichnung finden. So ist die ältere Bezeichnung „Elutions-Elektrophorese“ nicht zutreffend, weil die Banden aufgrund ihrer Ladung und des herrschenden elektromagnetischen Feldes aus dem Gel-Ende heraustreten und vom „Elutionspuffer“ mitgenommen werden. Ein Elutionsvorgang findet hier nicht statt. Sollte doch ein Elutionsvorgang stattfinden, so müßte dieser aufgrund des Fehlens einer mobilen Phase mit einer Diffusion gekoppelt sein. Die Wanderung der Banden durch das gesamte Gel in sehr scharfen Zonen (bei farbigen Verbindungen wie Bromphenolblau, Ferritin oder Cytochrom c mit bloßem Auge zu erkennen) spricht jedoch eindeutig gegen eine Diffusion.

Auch die moderne Bezeichnung High Performance Electrophoresis (HPE) ist hier nicht zutreffend, denn damit wird das Verfahren nicht beschrieben, und was die Hochleistung hinsichtlich der Auflösung angeht, sind andere elektrophoretische Verfahren (z. B. Elektrofokussierung) diesem Verfahren weit überlegen.

Auch die hier gewählte Bezeichnung „Durchfluß-Elektrophorese“ ist nicht optimal. Sie ist aber unserer Ansicht nach eher akzeptabel.

Bei näherer Betrachtung der Durchfluß-Elektrophorese hinsichtlich der Trennleistung läßt sich feststellen, daß das angewandte elektrophoretische System die gleiche Trennleistung aufweist wie das gleiche System unter üblichen Arbeitsbedingungen. Die Tatsache aber, daß unter Durchfluß-Elektrophorese-Arbeitsbedingungen erstaunlich kurze Trenngelhöhen (etwa 2–3 mm) gute Trennungen zu leisten imstande sind, ist nicht auf eine höhere Trennleistung des Systems zurückzuführen, sondern liegt darin begründet, daß eine der wichtigsten Aufgaben des Trenngels unter „normalen“ Bedingungen, nämlich die getrennten Banden bis zur Beendigung der Elektrophorese zu halten, hier völlig entfällt.

Die Optimierung der Gel-Länge bei gegebenem elektrophoretischen System (Gelzusammensetzung, pH)

ist hier nicht nur wegen der damit verbundenen kürzeren Analysenzeit von Bedeutung, denn je kürzer die Gele sind, um so stabiler sind sie und umso häufiger lassen sie sich wiederverwenden. Weisen zum Beispiel zwei Proteine A und B eine relative Wanderungsgeschwindigkeit von 0,98 auf (Wanderungsgeschwindigkeit von B/Wanderungsgeschwindigkeit von A), so ist eine Trenngelhöhe von 25 mm optimal, denn hierbei hat B eine Laufstrecke von 0,5 mm im Gel vor sich, während A das Gel verlassen hat. Dieser Trenneffekt wird durch die im Puffer höhere Wanderungsgeschwindigkeit der aus dem Gel herausgetretenen Komponenten erheblich verstärkt.

Durch die hohe Kapazität des Polyacrylamidgels sowie durch das Laufen der Banden in scharfen Zonen wird der beim Austreten der Banden (vom Gelende in den Puffer) auftretende Verdünnungseffekt überkompensiert. Weiterhin läßt sich dieser Effekt durch geeignete Maßnahmen, wie zum Beispiel geringere Fließgeschwindigkeit des Spülpuffers oder hohe Stromstärke, auf ein Minimum reduzieren (Abb. 8). Es lassen sich hierdurch im Durchschnitt einzelne Fraktionen in Retentionsvolumina von 0,2 bis 3,0 ml erhalten.

Im Zusammenhang mit der Betrachtung des Trenngels als stationäre Phase soll hier nicht unerwähnt bleiben, daß der Versuch, ATP von ADP unter den geschilderten Bedingungen zu trennen (Abb. 5), fehlgeschlagen ist. Da aber ATP eine höhere Nettoladung aufweist und beide Moleküle, bezogen auf die Porengröße des Gels, als gleich groß zu betrachten sind, läßt sich annehmen, daß ATP eine höhere Affinität zur Gelmatrix aufweist.

Schließlich soll hier erwähnt werden, daß sich die Durchflußelektrophorese bei einer Reihe anderer Trennprobleme bewährt hat: Carbonsäuren, Aminosäuren, Aminosäure-Derivate, Proteingemische, Peptide, Purin- und Pyrimidinbasen, Nucleotide, Nucleoside, saure und basische Pharmaka, Naturprodukte wie Schlangengifte, Seren und Urinproben.

## Danksagung

Wir danken der Firma Ernst Schütt jr. für ihre freundliche Unterstützung.



**Literatur**

1. Neuhoff, V. (1984) *Electrophoresis '84, Proceedings of the Fourth Meeting of the International Electrophoresis Society*. Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.
2. Maurer, H. R. (1971) *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
3. Allen, R. C., Saravis, C. A. & Maurer, H. R. (1984) *Gel Electrophoresis and Isoelectric Focussing of Proteins*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
4. Hjertén, S. (1983) *J. Chromatogr.* 270, 1–6.
5. Hjertén, S. (1967) *Chromatogr. Rev.* 9, 122–219.
6. Hjertén, S. (1963) *J. Chromatogr.* 11, 66–70.
7. Ming-de Zhu & Hjertén, S. (1984) In: *Electrophoresis '84, Proceedings of the Fourth Meeting of the International Electrophoretic Society*, Verlag Chemie Weinheim, Deerfield/Florida, Basel, pp. 110–113.
8. Wieland, T. & Turba, F. (1953) In: *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie* 2, 4. Aufl. (Müller, E., ed.): *Analytische Methoden*, pp. 871–909, Thieme Verlag, Stuttgart.
9. Engelhardt, H. (1975) *Hochdruckflüssigkeitschromatographie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Priv. Doz. Dr. A. Kinawi  
Institut für Pharmazie  
Königin-Luise-Straße 2–4  
D-1000 Berlin 33

