

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 189—193, März 1969

Modifikation der Disc-Elektrophorese zur direkten Gewebselektrophorese von Kryostatschnitten bioptisch gewonnener Gewebeproben¹⁾

Von F. MITTELBACH, W. ANTL und K. HAMBURGER²⁾

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München (Direktor Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel)

(Eingegangen am 26. November 1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel in dankbarer Verehrung zum 70. Geburtstag

Es wird eine Modifikation der Disc-Elektrophorese beschrieben, wobei Gewebeproben bioptischen Materials (Muskel) in Form von Kryostatschnitten direkt in das System eingebracht werden. Durch das diskontinuierliche Puffersystem sowie die Verschiedenheit von Sammelgel einerseits und Trenngel andererseits wird gewissermaßen Extraktion und elektrophoretische Trennung in einem Arbeitsgang durchgeführt. Die Versuchsanordnung ist einfach und gestattet zuverlässige und scharfe Trennungen der löslichen Proteinfraktionen. Die Reproduzierbarkeit ist gut.

A modified disc electrophoresis method for the direct tissue electrophoresis of cryostate biopsy samples

A distinct separation of tissue proteins is achieved by modified disc electrophoresis technique. Frozen tissue sections are applied directly to the gel. The separation is quick and convenient, and there is high reproducibility.

Die elektrophoretische Auftrennung von Gewebeproben hat zunehmend an Bedeutung und Interesse gewonnen. Die hierzu notwendigen Gewebsextrakte erfordern zu ihrer Gewinnung größere Gewebsmengen, so daß bei bioptisch gewonnenem Material diese Untersuchungsmethoden nur begrenzt anwendbar sind. In besonderem Maße gilt dies für die Skelettmuskulatur, da die bei der Biopsie gewonnenen Gewebeproben auch für gleichzeitige histologische und histochemische Untersuchungen verwendet werden, und somit sparsamste Verwendung angezeigt ist. Zudem findet man eine große Reihe von Beeinflussungen bei Extrakt-elektrophoresen, wie z. B. unterschiedliche Auftrennung bei Anwendung verschiedener Elektrodenpuffer (1) oder unterschiedliche Löslichkeit der Proteine je nach Zusammensetzung und Ionenstärke des bei der Extraktion verwendeten Puffers. Eine Möglichkeit, die Proteintrennung mit den geringen vorhandenen Substanzmengen durchzuführen, bietet die unmittelbare Einbringung von Gewebsschnitten in ein geeignetes Elektrophoresesystem.

Einen Fortschritt brachte hier die von RAYMOND und WEINTRAUB (2), sowie DAVIS (3) und ORNSTEIN (4) entwickelte Elektrophorese in Polyacrylamidgel.

Die Vorzüge gegenüber anderen Gelen bestehen einmal in der beliebig zu variierenden Porengröße und in seiner Transparenz, zum anderen in der mechanischen und chemischen Stabilität über weite pH- und Temperaturbereiche und schließlich in dem in Folge des elektroneutralen Gelcharakters fast völligen Fehlen einer Elektrosmose. Die in diesem Trägermedium erhaltenen

Resultate zeigten neben einer überraschenden Vielfalt des Proteinmusters eine ausgezeichnete Trennschärfe der einzelnen Proteinbanden, sowie eine gute Reproduzierbarkeit.

Die von DAVIS und ORNSTEIN entwickelte Disc-Methode, welche den schon 1957 von POULIK (5) entdeckten elektrophoretischen Effekt eines diskontinuierlichen Puffersystems ausnützt, bringt zudem noch den Vorteil der einfachen und schnellen Ausführung einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit geringstem Materialaufwand. Diese Eigenschaften, sowie die für unsere Zwecke sehr dienliche apparative Anordnung veranlaßten uns, die Disc-Elektrophorese für unsere Untersuchungen zu übernehmen und unseren Bedürfnissen entsprechend zu modifizieren.

Methodik

Prinzip der Disc-Elektrophorese

Die Trennkapazität der von DAVIS und ORNSTEIN entwickelten Disc-Elektrophorese wird nach der Theorie von ORNSTEIN durch die verschiedenen Diskontinuitäten (pH und Ionenstärke der verwendeten Puffer, Porenweite der Gele) des Elektrophoresemilieus erreicht. Die elektrophoretische Trennung findet in Glasröhrchen statt, in denen zwei verschiedene Polyacrylamidgelschichten zur Polymerisation gebracht wurden.

Für die großporigen Gelabschnitte (Sammelgel, 2,5%) wird ein 0,5M Tris-Phosphat-Puffergemisch, pH 6,9, und für das kleinporeige 7proz. Trenngel ein 3,0M Tris-HCl-Puffer, pH 8,9, verwendet. Der Elektrodenpuffer besteht aus 0,05M Tris- 0,385M Glycin ($\mu = 0,11$), pH 8,3. Die Puffersysteme sind so gewählt, daß beim Anlegen der Spannung eine Ionenfront, bestehend aus schnell wandernden Chloridionen und langsamer wandernden Glycinionen, das großporige Gel durchläuft und sich die dort befindlichen Proteine des Untersuchungsmaterials in der Schicht zwischen diesen beiden Ionenarten ansammeln und mitwandern. Die Proteine erreichen das kleinporeige Trenngel maximal konzentriert in einer extrem dünnen Startzone. Auf Grund des pH-Wechsels erreicht die Chlorid-/Glycin-Ionenschicht hier eine größere Beschleunigung als sämtliche Proteine und eilt nun vor-

¹⁾ Mit Unterstützung der Friedrich-Baur-Stiftung, München und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁾ Diese Arbeit enthält wesentliche Teile der Inaugural-Dissertation von K. Hamburger.

aus. Sie hinterläßt im Trenngel einen Bereich mit relativ konstantem pH-Wert und Spannungsgradienten, in dem die Proteine einer normalen Trägerelektrophorese nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, kombiniert mit einer Gelchromatographie nach Molekülgestalt und -größe unterworfen werden.

Elektrophoreseapparat

Die Geräte, die für die Disc-Elektrophorese gebraucht werden, sind verhältnismäßig einfach und lassen sich leicht ohne größere Kosten selbst herstellen.

Anfangs verwendeten wir das bei (6) beschriebene Gerät. Bei den ersten Auftrennungen beobachteten wir eine relativ starke Wärmeentwicklung in den Röhren mit teilweiser Verflüssigung des Sammelgels. Da aber eine Kühlung in dieser Apparatur auf gewisse technische Schwierigkeiten stieß, fertigten wir ein zylindrisches Disc-Elektrophorese-Gerät an, welches unseren Forderungen nach einer Kühlung der Gelröhren entsprach. Dies erreichten wir dadurch, daß wir den Abstand zwischen Kathodenpuffergefäß, Anodenträger (der gleichzeitig zur senkrechten Führung der Röhren dient) und Oberrand des Anodenpuffergefäßes so gering wie möglich hielten, so daß die Röhren zum größten Teil in das Anodenpuffergefäß hineinragten.

Füllt man nun das untere Puffergefäß mit Elektrodenpuffer von 0—5° (Kühlschranktemperatur) bis 0,5 cm unter den Rand, so tauchen die Gelröhren einschließlich der Probenschicht völlig in die kalte Pufferlösung ein. Sollte eine stärkere Kühlung notwendig sein, so kann man dies leicht durch Einbau einer Kühltischschlange aus Glas in das untere Puffergefäß oder dadurch, daß man das untere Puffergefäß in eine Kältemischung aus Eis und Wasser stellt, erreichen.

Folgende Lösungen kamen entsprechend den Angaben von DAVIS und ORNSTEIN zur Verwendung. Lediglich für das großporige Gel wurde davon abweichend statt 'Tris-HCl-Puffer' ein Tris-Phosphat-Puffer, pH 6,9 benützt (7).

Lösungen

A	3,0M Tris-HCl-Puffer, pH 8,9
	1N HCl 48,0 m/
	Tris 36,6 g
	TEMED ³⁾ 0,23 m/
	dest. Wasser auf 100 m/
B	0,5M Tris-Phosphat-Puffer, pH 6,9
	1M H ₃ PO ₄ 25,6 m/
	Tris 5,7 g
	TEMED 0,46 m/
	dest. Wasser auf 100 m/
C	Acrylamid 28,0 g
	BIS 0,735 g
	dest. Wasser auf 100 m/
D	Acrylamid 10,0 g
	BIS 2,5 g
	dest. Wasser auf 100 m/
E	Riboflavin 4,0 mg/100 m/
F	Saccharose 40,0 g/100 m/
G	Ammoniumperoxydisulfat 140 mg/100 m/
	Elektrodenpuffer (Tris-Glycin, pH 8,3):
	Glycin 28,8 g
	Tris 6,0 g
	dest. Wasser auf 2 l

Für die Elektrophorese werden die gereinigten Glasröhren (Länge 10 cm, innerer Ø 5 mm, bei 2,0 und 3,5 cm markiert) mit dem markierten Ende nach unten in zur Hälfte durchbohrte Gummistopfen gesteckt und mit einer langen Hohlzylinder nochmals mit dem Gelpuffer B ausgespült. Die erforderlichen Polymerisationsmischungen werden kurz vor Gebrauch aus den Grundlösungen A—G hergestellt.

³⁾ TEMED = N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin; BIS = N,N'-Methylenbisacrylamid.

Für das großporige Sammelgel:
1 Teil B, 1 Teil E, 2 Teile D, 4 Teile F (v/v).

Für das kleinporige Trenngel:
1 Teil A, 1 Teil Wasser, 2 Teile C, 4 Teile G (v/v).

Bis zur Marke 2,0 cm werden die Röhren nur mit großporigem Probengel aufgefüllt und nach Überschichtung mit einem Tropfen Wasser etwa 20 Min. lang zur Polymerisation zwischen zwei parallel verlaufende Leuchtstoffröhren gestellt (in der Originalmethode ist UV-Licht empfohlen, unserer Erfahrung nach erfolgte die Polymerisation mit Neonleuchten sogar besser). Diese unterste Gelschicht dient der Abdeckung der Gewebeprobe gegen den Elektrodenpuffer. Nun trägt man 0,02 m/ einer Lösung aus Gelpuffer B und Saccharoselösung (1:4, v/v) auf das Gel auf.

Das Gewebe, das untersucht wurde, stammte von vier verschiedenen Patienten, welche keinerlei Anzeichen einer pathologischen Muskelveränderung besaßen, was durch die vorgenommenen histologischen und histochemischen Untersuchungen bestätigt wurde. In allen vier Fällen handelte es sich um bioptisch erhaltene Muskelstücke aus dem M. tibialis anterior, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Kühltruhe bei -60° aufbewahrt. Man schneidet im Kryostaten von dem Muskelstück eine Anzahl 40 µm dicker Schnitte. Bei einer Anschnittfläche von ungefähr 25 mm² sind etwa 2 Schnitte für ein Röhren ausreichend (8).

Mit einem kleinen, 4 mm breiten Spatel werden die benötigten Schnitte aufgenommen und so zusammengefaltet, daß sie, ohne an der Wand des Röhrens anzustreifen, in die 0,02 m/ Puffer-Saccharose-Schicht eingebaut werden können. Nach dem Abstreifen erfolgt durch Hin- und Herbewegen des Spatels eine grobe Zerkleinerung des Muskelgewebes, damit es sich möglichst homogen und eben auf die Geloberfläche auflegt. Noch schwebende größere Teilchen können mit der Spatelspitze durch leichtes Andrücken an den Gelboden fixiert werden. Sind alle acht Röhren auf diese Weise gefüllt worden, schichtet man Sammelgel bis zur Marke 3,5 cm darüber und läßt 20 Min. polymerisieren. Als letztes erfolgt die Beschickung mit dem kleinporigen Trenngel, dessen Polymerisation nach etwa 30 Min. beendet ist.

Die so vorbereiteten Röhren werden in den Elektrophorese-Apparat eingeführt. Es wird eine Stromstärke von 2,5 mA/Gel eingestellt. Ein Zusatz von 0,5 m/ einer 0,001proz. wäbr. Bromphenolblaulösung pro 100 m/ Pufferlösung (3) zum Kathodenpuffer dient der Sichtbarmachung der wandernden Pufferfront. Nach etwa 110 Min. ist die Auftrennung beendet. Die Puffergrenze durchlief in allen unseren Versuchen die Gelsäulen in den einzelnen Röhren gleichmäßig schnell, so daß eine gute Vergleichsmöglichkeit der Ergebnisse gewährleistet ist. Nach Beendigung der Auftrennung werden die Gelsäulen durch Umfahren mit einer Hohlzylinder bei gleichzeitigem Einspritzen von Glycerin aus den Glasröhren entfernt und in einer Lösung von 1% Amidoschwarz in 7proz. Essigsäure 15—60 Min. gefärbt.

Die Entfärbung erfolgte elektrophoretisch in 7proz. Essigsäure anfangs mit unserem Disc-Elektrophorese-Gerät in Auftrennrichtung. Da es jedoch nicht möglich war, auf diese Weise die relativ starke Hintergrundfärbung der Gele selbst bei Anwendung sehr langer Entfärbzeiten 2,5—5,0 mA/Gel bis zu 24 Stdn.) zu verringern, und Versuche mit anderen Proteinfärbstoffen wie Coomassie Brilliant Blau R-250 (9, 10, 11), Procion Brilliant Blau RS (12, 7), Bromphenolblau, Lichtgrün und Azokarmin B keinerlei Verbesserung brachten, entschlossen wir uns zu einer elektrophoretischen Entfärbung der Gele senkrecht zur Auftrennungsrichtung (13—16).

Hierzu fertigten wir aus Plexiglas eine kühlbare Apparatur zur Untergrund-Entfärbung von Gelen in horizontaler Lage (Abb. 1). Die Entfärbekammer ist von einem Kühlmantel umgeben, in dem man je nach Erwärmung Kühlwasser zirkulieren lassen kann. Eine Trennwand teilt die Entfärbekammer in zwei Kompartimente.

Diese Trennwand besteht aus 3 Teilen:

1. Der U-förmige Rahmen von 5—6 mm Dicke nimmt die Gelsäulen auf.
2. Das vor ihm befestigte Gitter verhindert ein Herausfallen der Gelsäulen.

3. Die an der Hinterfront des U-Rahmens befestigte Glasfritte P₄ (Firma Schott, Mainz) erfüllt die Aufgabe einer Diffusionsmembran.

Die parallel zueinander stehenden Kohleelektroden sind am Deckel befestigt und tauchen beiderseits der Trennwand parallel zu ihr in die beiden Kompartimente der Entfärbekammer ein.

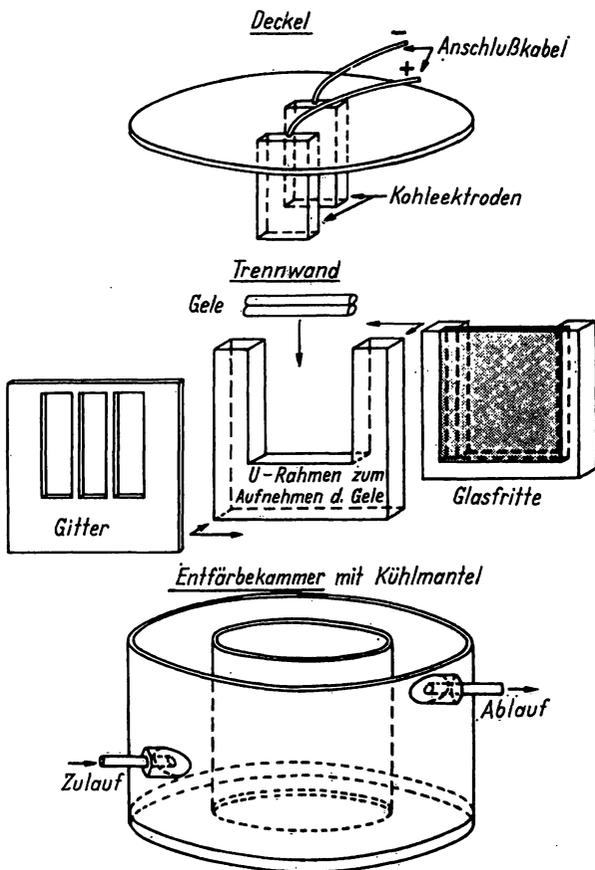


Abb. 1

Gerät zur Untergrund-Entfärbung von Disc-Elektrophorese-Säulen in horizontaler Lage

Eine 3stdg. elektrophoretische Entfärbung der Gelsäulen bei 20–25 mA/Gel (14) brachte eine wesentliche Verringerung der Hintergrundfärbung. Völlig ließ sich die Untergrundfärbung jedoch auch mit dieser orthogonalen Entfärbemethode nicht beseitigen. Die Ursachen hierfür sind uns nicht bekannt.

Ergebnisse

Die Auftrennung der Muskelproteine des Menschen gab ein in den Grundzügen sich regelmäßig wiederholendes Bild, was die einwandfreie Reproduzierbarkeit unserer Methode unterstreicht (Abb. 2). Das zum Teil bis zu 4 Monate in der Kühltruhe aufbewahrte Muskelgewebe zeigte keine Änderung des Proteinmusters bei der elektrophoretischen Trennung gegenüber frischen Geweben. Dies entspricht den Ergebnissen von DIETZ und LUBRANO (17), die zeigen konnten, daß selbst nach mehrmonatiger Lagerung von Seren bei -65° der Verlust von Enzymaktivität nach disc-elektrophoretischer Auftrennung nur etwa 10% betrug und das Proteinmuster unverändert blieb. Während der Elektrophorese läßt sich mit bloßem Auge eine bräunliche Eiweißbande erkennen, die nach dem Abschalten des Stromes ungefähr bis zur Mitte des Trenngels ge-

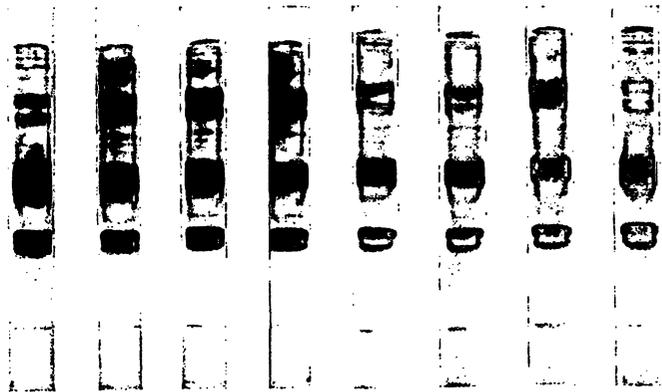


Abb. 2

Versuchsreihe mit Muskelgewebe vom Menschen (8 Gele einer Auftrennung ein und derselben Gewebeprobe)

wandert ist. Es war festzustellen, daß sich die Intensität der Bande je nach dem Grad der Blutbeimengung des excidierten Muskelstückes änderte, was ein Hinweis auf Hämoglobin gibt. Diese bräunlich-rote Eiweißbande stellt nach der Anfärbung mit Amidoschwarz die stärkste Fraktion des Proteinmusters dar und zeigt eine positive Peroxydasereaktion. Bei fast allen diesen

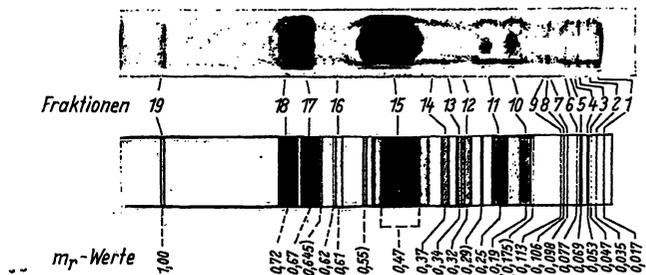
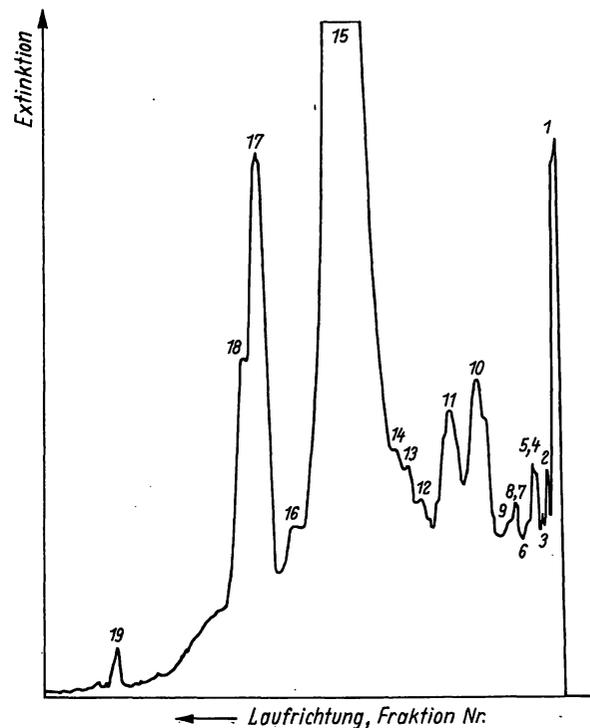


Abb. 3

Elektropherogramm von Muskelgewebe des Menschen. Schematische Darstellung der Fraktionen mit Angabe der mittleren Wanderungsgeschwindigkeiten (m_r-Werte) und densitometrische Kurve (Vergrößerung: Originalgel: Original-Densitometerkurve = 1:2; verwendet wurde der Graukeil der Fa. Joyce, Loebel & Co. Ltd.)

Nachweisreaktionen zeigte sich eindeutig eine Zweiteilung dieser Bande (Hämoglobin neben Myoglobin?), die allerdings innerhalb kurzer Zeit zu einer breiten Fraktion verschmolz. Am kathodischen Ende des Trenngels befinden sich konstant 9—10 feine Banden, die sich gegen eine immer vorhandene Hintergrundfärbung jedoch scharf abgrenzen lassen.

Es folgen regelmäßig 2 starke, sich intensiv anfärbende Proteinfractionen und 3—4 schwächere Banden. Unterhalb der oben bereits erwähnten stärksten Fraktion, die sich etwa in der Mitte des Trenngels befindet, folgen 2—3 schwache Fraktionen, denen sich im anodischen Teil des Trenngels regelmäßig 2 breite, intensiv gefärbte Banden anschließen. Dieses Proteinmuster war in erstaunlich hohem Maße immer reproduzierbar (s. Abb. 2).

Um dieses Proteinmuster zahlenmäßig zu erfassen, bedienten wir uns, wie viele andere Autoren, mangels anderer Differenzierungsmöglichkeiten, der relativen Beweglichkeit (m_r -Werte) der einzelnen Eiweißfraktionen (Abb. 3).

In dieses Schema sind alle Fraktionen eingezeichnet, die bei optimaler Elektrophorese in allen vier Fällen gefunden worden sind. Die eingeklammerten m_r -Werte kennzeichnen Fraktionen, die sich nur vereinzelt darstellen.

Für die densitometrische Auswertung der Gelsäulen wurde das „Double Beam Recording Mikrodensitometer MK IIC“ der Firma Joyce, Loebel & Co., Ltd.-England, benutzt.

Eine quantitative Auswertung der erhaltenen Kurven und somit eine Aufteilung der Proteinfractionen in relativen Prozentangaben ist mit einem so großen Fehler (10—20%) behaftet, daß man daraus keine objektiv verwertbaren Aussagen machen kann.

Diskussion

Der elektrophoretischen Analyse von Körperflüssigkeiten, speziell des Serums, zur Aufklärung pathologischer Verhältnisse steht eine relativ große Menge an Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Andere Voraussetzungen treffen wir dagegen bei der elektrophoretischen Untersuchung von bioptisch gewonnenen Gewebeproben, z. B. des Muskels an. Die Erfassung von Proteinveränderungen bei pathologischen Prozessen im Bereich des Muskelgewebes im Rahmen der klinischen Diagnostik ist von größtem Interesse. Doch ist es nicht immer leicht, genügend große Mengen an Muskel zur Herstellung von Extrakten zu erhalten, wenn es sich um bioptisches Material handelt, das auch für histologische und histochemische Untersuchungen dienen soll.

Mikroelektrophoresen, wie sie von FELGENHAUER (8) oder PUN und LOMBROZO (18) angegeben wurden, lösen dieses Problem auch nicht, da sie in der Methodik kompliziert sind und nur ganz speziellen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die Herstellung von Gewebsextrakten bringt neben dem zusätzlichen Zeitaufwand noch weitere Unsicherheits-

faktoren mit sich, die von der Exaktheit der Zusammensetzung und der Ionenstärke des zur Extraktion verwendeten Puffers, sowie der Homogenisierung und Zentrifugation des Gewebes abhängen. Aus diesen Gründen bietet die unmittelbare Einbringung von Gewebsschnitten in ein geeignetes Elektrophorese-system die Möglichkeit, eine Eiweißtrennung mit der geringen vorhandenen Substanzmenge durchzuführen und den Arbeitsaufwand auf ein Minimum zu beschränken.

Die direkte Gewebselektrophorese ist bis jetzt lediglich in einigen wenigen Fällen in der Literatur beschrieben worden. So erwähnten WIEME (19) und DENTS (20) die Möglichkeit der unmittelbaren Einbringung von bi-optischem Gewebematerial in Agargel, während diesbezügliche Hinweise für die Stärke- und Polyacrylamid-gel-Elektrophorese bis jetzt fehlen. Am nächsten kommt ihr die Methode von MATOLSTY (21), der für seine Untersuchungen lyophilisiertes Gewebe als Pulver zwischen zwei Schichten von feinen Glasperlen mit in das großporige Gel einpolymerisierte.

Der Ausgangspunkt unserer Überlegungen war, mit den gegebenen Möglichkeiten eine schnelle und einfache elektrophoretische Trennung zu erreichen, die dennoch exakte und reproduzierbare Ergebnisse liefern sollte. Eine wesentliche Rolle spielte dabei die Forderung, daß das bioptische Material, das zur histologischen und histochemischen Untersuchung entnommen wurde, auch noch für die Elektrophorese ausreichen mußte. Die Vorteile einer kombinierten histologischen, histochemischen und elektrophoretischen Auswertung einer extrem dünnen Muskelschicht liegen klar auf der Hand. Die zweite Bedingung, die erfüllt sein sollte, war die Anwendbarkeit der Elektrophoresetechnik auch für die klinische Auswertung. Mit der Disc-Elektrophorese gelang es uns, diesen Forderungen zu genügen und mit der bei einer einmaligen Muskelbiopsie gewonnenen Substanzmenge eine brauchbare und gut reproduzierbare direkte Gewebselektrophorese durchzuführen.

Bei den ersten Versuchen konnte gegen Ende der Elektrophorese eine teilweise Verflüssigung des Sammelgels beobachtet werden, die auf der relativ starken Erwärmung dieses Gelbereiches beruhte. Darauf läßt sich ein mehr oder weniger starkes Absinken der Schnitte und eine unscharfe Trennung zurückführen. Durch Benutzung unseres Disc-Elektrophorese-Gerätes wurde eine gute Kühlung aller Gelabschnitte, ausgenommen den Bereich der Schicht kathodenwärts der Probe, erreicht. Die oben genannten Erscheinungen ließen sich so vermeiden. Die Auftrennung war vollständiger und gleichmäßiger. Eine Standardisierung in bezug auf die genaue Bestimmung der zur Auftragung gekommenen Proteinmenge ließe sich relativ leicht erreichen, indem man mit einem dünnen Korkbohrer aus dem gefrorenen Gewebestück einen Zylinder austanzt und zum Schneiden im Kryostaten verwendet. Somit hat man bei Verwendung einer gleichen Anzahl von Gewebsschnitten eine bestimmbare und immer gleichbleibende Proteinmenge.

Ist Vollautomatisierung Ihrer naßchemischen Analyse zu teuer?

Sie sind wahrscheinlich bereits zu diesem Schluß gekommen. Andererseits ist konventionelle Handpipettierung zu zeitraubend, bei Verwendung von toxischen oder krebserregenden Chemikalien zu riskant, außerdem nicht sehr genau. Wählen Sie dann FISIONS Halbautomatische Systeme, die aus Pipettier- und Verdünnungsautomaten bestehen. Die Einheit ist mit 29 cm x 13 cm x 9 cm sehr kompakt und findet überall Platz. Der FISIONS-Handgriff ist einzigartig und erlaubt eine Fernsteuerung der Halbautomatischen Systeme durch Knopfbedienung von jedem beliebigen Platz des Tisches aus. Einen großen Zeitgewinn erzielt man bei allen konventionellen klinischen Methoden wie z.B. beim Nachweis von Natrium, Kalium, Blutharnstoff, Glukose, Hämoglobin, Gesamteiweiß etc.



Die übersichtlichen Gerätesysteme arbeiten sehr zuverlässig.

Sie wurden in 3-jähriger Forschungsarbeit bei FISIONS entwickelt und ergänzen in der klinischen Chemie vorhandene Laborgeräte für Routinearbeiten.

FISIONS Fisons Limited International Division,
9 Grosvenor St, London W1X 0AH

Prüfen Sie, wie dieses einfache System Ihre Arbeit erleichtern kann. Fordern Sie technische Beschreibungen an. Wegen weiterer Einzelheiten und einer Demonstration wenden Sie sich bitte an eines unserer Verkaufsbüros mit Kundendienst:

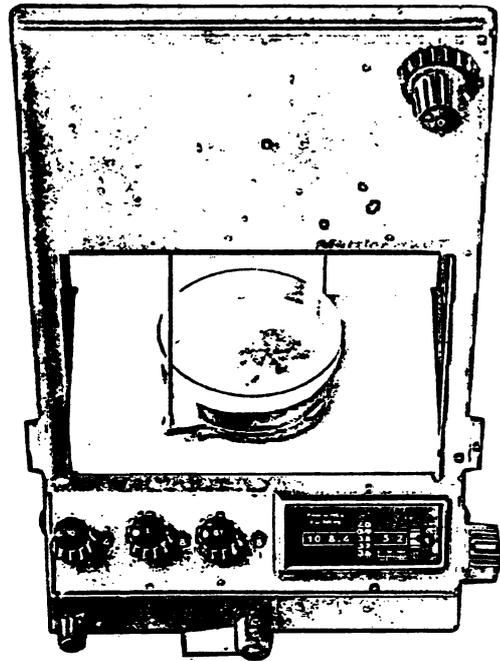
Günther Schmidt,
2 Hamburg 68,
Postfach 680104

Hans Joachim Kleinfeld,
3 Hannover 1,
Postfach 3303.

IMA GmbH & Co.
63 Giessen,
Marburgerstraße 81.

Bender & Hobein
GmbH, Karlsruhe,
München, Freiburg.

FSA 17



10 000 Mettler-Analysen- und Präzisionswaagen

hat unsere Gesellschaft von April 1950 bis Mai 1968 in Deutschland verkauft. Ein beispielloser Erfolg! Wir haben in den Jahren 1950 bis 1957 die Marke Mettler auf dem deutschen Markt eingeführt und fast zwei Jahrzehnte lang an der starken Verbreitung moderner Feinwaagen maßgebend mitgewirkt. Wir beraten und beliefern Sie gern.

Autorisierte Mettler-Vertretung:
Colora Messtechnik GmbH
7073 Lorch/Württ., Postfach 5
T (07172) 6041, FS 07-248 886

Technische Büros (Verkauf und Kundendienst):
1000 Berlin 30, Kurfürstenstraße 84, T 13 52 00
2000 Hamburg 19, Osterstraße 63, T 40 06 06, FS 02-12 947
3000 Hannover, An der Tiefenriede 45, T 88 45 00
4000 Düsseldorf, Kronprinzenstr. 62, T 1 78 60, FS 08-587 253
6000 Frankfurt/M., Röderbergweg 4-6, T 44 60 31, FS 04-11 216
7073 Lorch/Württ., Barbarossastr. 3, T 60 41, FS 07-248 886
8000 München 2, Dachauer Straße 175, T 516 98 58

colora

Die Injektion

Technik — Praxis — Komplikationen. Von Dr. med. Dr. med. dent. **Joachim Gabka**. Groß-Oktav. XII, 205 Seiten. Mit 73, z. Tl. mehrfarbigen Abbildungen. 1968. Plastik flexibel DM 20,—

Allgemeine Mikrobiologie

Leitsätze für Studierende und Ärzte. Von Prof. Dr. med. **Ulrich Schneeweiß**. Unter Mitarbeit von **Eva-Maria Fabricius**. Mit 111 Abbildungen und 47 Tabellen. XII, 343 Seiten. 1968. Plastik flexibel DM 20,—

Spezielle Mikrobiologie

Leitsätze für Studierende und Ärzte. Von Prof. Dr. med. **Ulrich Schneeweiß**. Unter Mitarbeit von **Eva-Maria Fabricius**. Groß-Oktav. Mit 158 Abbildungen und 39 Tabellen. XII, 477 Seiten. 1968. Plastik flexibel DM 30,—

Praktikum der Physiologischen Chemie

von Dr. **Peter Siegmund**, Dr. Dr. **Ernst Schütte** und Dr. **Friedrich Körber**. Mit 49 Abbildungen und vielen Formeln. Oktav. XVI, 287 Seiten. 1968. Plastik flexibel DM 19,80

Lehrbuch der Physiologischen Chemie

von Prof. **Franz Leuthardt**. Begr. von S. Edlbacher. 15., neubearbeitete Auflage. Groß-Oktav. Mit 76 Abbildungen, 1 Bildtafel. XVI, 912 Seiten. 1963. Plastikeinband DM 42,—

Praktische Gynäkologie

Für Studierende und Ärzte von Prof. Dr. med. Dr. phil. **W. Pschyrembel**. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Oktav. Mit 503, teils mehrfarbigen Abbildungen. XXIV, 642 Seiten. 1968. Plastikeinband DM 54,—

Praktische Geburtshilfe

Für Studierende und Ärzte von Prof. Dr. med. Dr. phil. **W. Pschyrembel**. 12./13. Auflage. Oktav. Mit 502, davon 3 mehrfarbigen Abbildungen. XXIV, 807 Seiten. 1967. Plastikeinband DM 65,—

Anatomie des Menschen

Für Studierende und Ärzte, dargestellt nach systematischen, topographischen und praktischen Gesichtspunkten von Prof. Dr. med. et phil. **A. Waldeyer**, unter Mitarbeit von **Ursula Waldeyer**. 2 Teile. Groß-Oktav. Ganzleinen.

1. Teil: Allgemeine Anatomie, Rücken, Bauch, Becken, Bein. 6., überarbeitete Auflage. Mit 335, meist farbigen Abbildungen. XVI, 447 Seiten. 1969. DM 48,—

2. Teil: Kopf und Hals, Auge, Ohr, Gehirn, Arm, Brust. 4. und 5., überarbeitete Auflage. Mit 447, zum großen Teil farbigen Abbildungen. XVI, 602 Seiten. 1967. DM 62,—

Augenheilkunde

Leitfaden für Studium und Praxis von Prof. Dr. med. **Hugo Gasteiger**. 2., neubearbeitete und erweiterte Auflage. Groß-Oktav. Mit 277, zum großen Teil mehrfarbigen Abbildungen. XVI, 303 Seiten. 1963. Ganzleinen DM 45,—

Ohren-, Nasen-, Rachen- und Kehlkopfkrankheiten

Begr. von **A. Knick**. 35./36., neu bearbeitete und ergänzte Auflage von o. Prof. Dr. **Gerhard Eigler**. Groß-Oktav. Mit 164, teilweise mehrfarbigen Abbildungen. XVI, 261 Seiten. 1966. Plastikeinband DM 28,—



Walter de Gruyter & Co · Berlin 30

Über die Identifikation der getrennten Eiweißfraktionen sind Untersuchungen im Gange, sie werden an anderer Stelle mitgeteilt. Vergleiche mit Disc-Elektrophoresen von Muskelgewebe des Menschen in Polyacrylamidgel konnten nicht angestellt werden, da entsprechende Versuche bis jetzt fehlen. Aus Untersuchungen mit Muskelextrakten in Agargel von BAUER (22), sowie in

Stärkegel von HUGHES (1, 23) können infolge der zu unterschiedlichen Methoden keine Rückschlüsse für eine zusätzliche Identifizierung der Proteinfractionen gezogen werden, doch sind durch die Anwendung der direkten Gewebsselektrophorese in Polyacrylamidgel die früher beobachteten Schwierigkeiten beseitigt.

Literatur

1. HUGHES, B. P., *Clin. Chim. Acta Amsterdam* 6, 794 (1961). —
2. RAYMOND, S. und L. WEINTRAUB, *Science Washington* 130, 711 (1959). —
3. DAVIS, B. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964). —
4. ORNSTEIN, L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321 (1964). —
5. POULIK, M. D., *Nature London*, 180, 1477 (1957). —
6. ANTL, W. K., *Inaugural-Dissertation*, München (1968). —
7. MAURER, H. R., *Disk-Elektrophorese*, Walter de Gruyter & Co., Berlin (1968). —
8. FELGENHAUER, K., *Biochim. biophysica Acta Amsterdam*, 133, 165 (1967). —
9. MAIZEL, J. V., *Science Washington*, 151, 988 (1966). —
10. CHRAMBACH, A., R. A. REISFELD, M. WYCKOFF und J. ZACCARI, *Analytic. Biochem.* 20, 150 (1967). —
11. MEYER, T. S. und B. L. LAMBERTS, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 107, 144 (1965). —
12. ST. GROTH, F. S. De., R. G. WEBSTER und A. DATYNER, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam*, 71, 377 (1963). —
13. SCHWABE, C., *Analytic. Biochem.* 17, 201 (1966). —
14. SCHRAUWEIN, J. A. M., *J. Chromatogr.* 15, 256 (1964). —
15. MAURER, H. R., *disc. Z.* 4, 85 (1966). —
16. NAGY, L. K., B. ROGERSON und N. TOMKUSS, *Nature London* 212, 923 (1966). —
17. DIETZ, A. A. und T. LUBRANO, *Analytic. Biochem.* 20, 246 (1967). —
18. PUN, J. Y. und L. LOMBROZO, *Analytic. Biochem.* 9, 9 (1964). —
19. WIEME, R. J., *Agar Gel Electrophoresis*, Elsevier Publishing Company; Amsterdam, London, New York (1965). —
20. DENIS, L. J., G. R. PROUT, VA. RICHMOND, M. VAN SANDE und K. VAN CAMP, *J. Amer. Med. Ass.* 178, 1093 (1961). —
21. MATOLSTY, A. G. und M. N. MATOLSTY, *J. Investigat. Derm. Baltimore* 41, 255 (1963). —
22. BAUER, H., F. GLÖTZNER, I. SCHWARZE und K. SCHMALBACH, *Klin. Wschr.* 42, 1198 (1964). —
23. HUGHES, B. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1, 194 (1959).

Priv.-Doz. Dr. F. Mittelbach
800 München 15
Ziemssenstr. 1