

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 49 (1958)
Heft: 2

Artikel: Die Papierelektrophorese von Eierproteinen. 1. Mitteilung, Anwendung der Papierelektrophorese auf die Untersuchung von Lebensmitteln
Autor: Hellhammer, D. / Högl, O.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982528>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 06.05.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN

Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE

Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

ABONNEMENT:

Schweiz Fr. 17.— per Jahrgang (Ausland Fr. 22.—)
Suisse fr. 17.— par année (étranger fr. 22.—)

Preis einzelner Hefte Fr. 3.— (Ausland Fr. 4.—)
Prix des fascicules fr. 3.— (étranger fr. 4.—)

BAND – VOL. 49

1958

HEFT – FASC. 2

Die Papierelektrophorese von Eierproteinen

Anwendung der Papierelektrophorese auf die Untersuchung von Lebensmitteln

1. Mitteilung

Von *D. Hellhammer* und *O. Högl*

(Eidg. Gesundheitsamt, Bern)

I. Teil

1. Grundsätzliches zur Methode

Als im Jahre 1937 die von *Arne Tiselius* entwickelte Methode der Elektrophorese (*Tiselius* 1937, 1950) erstmals auf die Proteinchemie Anwendung fand, trug dies entscheidend zur weiteren Erforschung dieses Gebietes bei. Die einzelnen Etappen dieser Entwicklung hat *Tiselius* in seinem Nobelvortrag dargestellt (*Tiselius* 1950).

Trotz der grossen Erfolge, die dank ihr erzielt wurden, haften der «klassischen» Elektrophorese leider gewisse Nachteile an, die ihren Anwendungsbereich begrenzen.

So ist die Einhaltung einer konstanten Temperatur von entscheidender Bedeutung, weshalb die Apparatur sich stets in einem Thermostaten, wenn möglich in einem thermokonstanten Raum, befinden soll. Um bei richtiger Führung des

Versuches möglichst gute und scharfe Schlierendiagramme zu erhalten, müssen alle wesentlichen Teile des Instrumentes und der Optik aus Quarzglas hergestellt sein. Auch in verschiedener anderer Hinsicht ist das Gerät nicht einfach zu handhaben.

Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die Anschaffungs- und Wartungskosten einer *Tiselius*-Apparatur beträchtlich sind, so dass sie meist nur in speziellen Forschungsinstituten und Universitätskliniken anzutreffen ist.

Um die Methode auch für Routineuntersuchungen nutzbar zu machen, wurde von verschiedenen Seiten versucht, handliche und preiswerte Geräte zu entwickeln. Es sei hier die Mikroelektrophoreseapparatur nach *Antweiler* erwähnt. (*Antweiler* 1950), bei der nur 0,2 ml Versuchslösung benötigt werden, sowie die Anordnung nach *Labhart* und Mitarbeitern (1951), die auf dem interferometrischen Prinzip beruht und bei der auch nur geringe Substanzmengen zur Untersuchung gelangen.

Obwohl die beiden letztgenannten Geräte eine bedeutende Vereinfachung darstellten, so besteht doch kein prinzipieller Unterschied gegenüber der *Tiselius*-Apparatur, da auch in ihnen die Veränderungen der wandernden kolloidalen Lösung erst über besondere optische Systeme sichtbar gemacht werden müssen. Eine Nutzbarmachung solcher Geräte in einfachen analytischen Laboratorien ist entsprechend kaum erfolgt.

Wesentlich anders zu betrachten ist die sog. «Papierelektrophorese», die seit den Jahren ihrer erstmaligen Anwendung einen ähnlichen Aufschwung erlebt hat wie die Papierchromatographie. Zwar haben *König* und *v. Klobusitzky* (1939) schon vor dem letzten Weltkrieg mit Elektrolytlösung getränktes Filtrierpapier zur Auftrennung von Farbstoffgemischen benutzt; es ist jedoch das Verdienst von *Haugaard* und *Kroner* (1948), *Wieland* (1948) und *Wieland* und *Fischer* (1948), die Methode zuerst zur Auftrennung von Aminosäuregemischen eingesetzt zu haben. Schon bald danach wurde versucht, sie zur Analyse von Proteinlösungen heranzuziehen (*Durum* 1950, *Turba* und *Enenkel* 1950, *Cremer* und *Tiselius* 1950, *Grassmann* und *Hannig* 1950), und zwar mit soviel Erfolg, dass seither die Veröffentlichungen auf diesem Gebiet eine Zahl erreicht haben, die spezielle Zusammenfassungen und Literaturverzeichnisse rechtfertigt (*Wunderly* 1953, 1954, 1956, *Lederer* 1955, *Schleicher & Schüll* 1946–1955).

Im Vergleich mit der klassischen Elektrophorese sind es mehrere Faktoren, welche der Papierelektrophorese zu ihrer starken Verbreitung verholfen haben:

- Die wesentlich geringeren Anschaffungskosten der Apparate.
- Geringere Raumbeanspruchung und Wartung.
- Weitaus einfachere Handhabung ohne entsprechende Einbusse an Genauigkeit.
- Anwendung minimaler Substanzmengen. Während für die klassische Elektrophorese zumindest einige ml Versuchslösung zur Verfügung stehen müssen, sind für die Untersuchungen mittels der Papierelektrophorese 0,01 bis 0,02 ml im allgemeinen ausreichend.
- Breiteres Anwendungsspektrum, da prinzipiell jede geladene Substanz und nicht nur kolloidale Lösungen zur Untersuchung gelangen können.

Aus den angeführten Gründen, besonders aber wegen der bescheidenen Kosten und der geringen Menge an Untersuchungsmaterial wurden die Geräte für papierelektrophoretische Trennungen zunächst besonders in Kliniken und Forschungslaboratorien zur Untersuchung der Blutproteine sowie sonstiger Körperflüssigkeiten verwendet.

Wenn die Bearbeitung und Abklärung dieser Gebiete auch heute noch den grössten Teil ihres Anwendungsbereiches ausmacht, so ist die Methode mit Erfolg auch auf vielen anderen Sektoren eingesetzt worden, so in der Identifizierung tierischer und pflanzlicher Produkte, in der Untersuchung von Pharmaka und Alkaloiden, sowie in der Analyse organischer und anorganischer Verbindungen (*Wunderly* 1953, 1956, *Lederer* 1955, *Schleicher & Schüll* 1946–1955), um nur einige Beispiele zu nennen.

Im allgemeinen besteht zwischen den Kurvenbildern und Resultaten der klassischen Elektrophorese und denjenigen der Papierelektrophorese eine befriedigende Uebereinstimmung (*Wunderly* 1954, *Grassmann und Hannig* 1952).

2. Faktoren, welche die Wanderung der Proteinteilchen bei der Elektrophorese beeinflussen

a) Ladung, Form und Grösse der Teilchen

Die Beweglichkeit eines punktförmigen Kugelkolloides lässt sich bei unendlicher Verdünnung in Analogie zur Ionenbeweglichkeit durch folgende Beziehung ausdrücken:

$$u = \frac{Q}{6 \pi r \eta} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{Volt}^{-1}$$

u = Beweglichkeit eines Kugelkolloids

Q = Ladung des Einzelteilchens

r = Radius des Teilchens

η = Viskosität des Mediums.

Werden die Versuche in wässrigem Milieu bei konstanter Temperatur durchgeführt, so kann in obige Formel die dieser Temperatur entsprechende Viskosität des Wassers eingesetzt werden, so dass die Beweglichkeit des Teilchens ausschliesslich eine Funktion seiner Ladung Q und seines Radius r wird.

Die *Ladung eines Proteinteilchens* ist jedoch nicht wie bei einfachen Ionen von der Wertigkeit abhängig, sondern ist wegen seines Ampholytcharakters vielmehr eine Funktion der im Molekül noch vorhandenen freien dissoziationsfähigen Gruppen, die sowohl saure wie basische Eigenschaften besitzen können.

Da praktisch alle $-\text{NH}_2$ - und $-\text{COOH}$ -Gruppen in α -Stellung zum Aufbau der Peptidkette herangezogen werden, ist der saure bzw. basische Charakter der meisten Proteine folgenden Gruppen zuzuordnen (*Cohn and Edsall* 1943):

- | | | |
|-------------|--------------------------------------|------------------|
| 1. Sauer: | Endständige COOH-Gruppen | = Asparaginsäure |
| | | Glutaminsäure |
| | Phenolische OH-Gruppen | = Tyrosin |
| | Thiol-Gruppen | = Cystein |
| 2. Basisch: | Endständige NH ₂ -Gruppen | = Lysin |
| | Guanidino-Gruppen | = Arginin |
| | Imidazol-Gruppen | = Histidin. |

Je nach Art und Anzahl der Aminosäuren, die am Aufbau des Proteins beteiligt sind, wird dieses einen Ueberschuss an sauren bzw. basischen Gruppen besitzen, oder es wird Gleichheit der beiden Gruppierungen und damit Ladungsgleichheit vorhanden sein (*Cohn and Edsall 1943, Greenberg 1951*). Der letztgenannte Fall ist ein Spezialbeispiel für den allen Proteinen und sonstigen amphoterer Stoffen eigenen isoelektrischen Punkt, der dadurch charakterisiert ist, dass bei einem bestimmten pH-Wert die nach aussen wirksame Nettoladung des Proteins gleich Null wird.

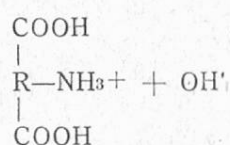
Während in dem obigen Beispiel Neutralpunkt und isoelektrischer Punkt zusammenfallen, ist das bei den meisten Eiweisstoffen nicht der Fall, sondern bei ihnen wird dieser Punkt mehr oder weniger im sauren bzw. basischen pH-Bereich liegen.

Wird beispielsweise ein Protein, dessen isoelektrischer Punkt (IEP) sich im sauren Gebiet befindet, in Wasser gelöst, so wird es gegenüber diesem Lösungsmittel vom pH 7,0 eine negative Ueberschussladung («Nettoladung») besitzen, die umso grösser ist, je stärker der IEP im sauren Gebiet liegt, d.h. je grösser die Anzahl saurer Gruppen ist.

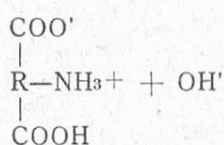
Die analoge Betrachtung gilt für ein Protein mit IEP im basischen Gebiet, mit dem Unterschied, dass die Nettoladung in diesem Fall dem Wasser gegenüber positives Vorzeichen besitzt.

Die Nettoladung sagt jedoch noch nichts über die Gesamtladung des Proteins aus, so dass in diesem Zusammenhang noch kurz der Unterschied zwischen beiden Arten des Ladungszustandes skizziert sei, wobei die Darstellung derjenigen von *Cohn* und *Edsall* entspricht.

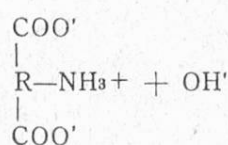
Bezeichnet man mit R das Peptidgerüst des Proteins, mit COOH bzw. NH₂ dagegen die freien sauren bzw. basischen Gruppen, so lassen sich die Verhältnisse an einem Eiweissmolekül mit saurer Ueberschussladung schematisch folgendermassen darstellen:



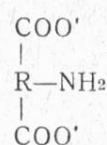
pH 2
A



pH 4
B



pH 7
C



pH 10
D

Aus der obigen Formulierung ergibt sich folgendes Bild:

Die Form A stellt das Protein in stark saurer Lösung dar, in der es eine positive Ladung trägt, wobei Gesamt- und Nettoladung identisch sind.

Wird durch Laugenzusatz das Proton der einen Säuregruppe freigesetzt, so sinkt die Nettoladung auf Null, während die Gesamtladung den Wert 2 annimmt. Da jedoch nach aussen hin keine Ladung wirksam wird und das Protein als Riesenzwitterion vorliegt, so ist damit die Bedingung des IEP erfüllt. (B)

Durch weiteren Laugenzusatz wird schliesslich auch das Proton der zweiten COOH-Gruppe abdissoziieren, so dass das Eiweissteilchen eine Nettoladung von -1 (= negative Ueberschussladung) besitzt, während die Gesamtladung 3 beträgt. Schematisch ist das etwa die Bedingung, wie sie sich einstellt, wenn das Proteinteilchen in Wasser gelöst ist. (C)

Die Verschiebung des pH-Wertes ins alkalische Gebiet wird die Abspaltung des kationisch gebundenen Protons zur Folge haben, so dass die Gesamtladung auf 2 zurücksinkt, während sich die Nettoladung auf -2 erhöht. (Form D)

Besitzt das Protein mehr basische als saure Endgruppen, so treten entsprechende Verschiebungen auf.

Je grösser somit der pH-Unterschied zwischen isoelektrischem Punkt und Proteinlösungsmittel ist, desto mehr saure bzw. basische Endgruppen werden ionisiert und desto stärker wird die nach aussen wirksame negative bzw. positive Ueberschussladung sein.

Form des Proteinteilchens. Die mathematische Ableitung der Beweglichkeit gilt streng genommen nur für punktförmige Kugelkolloide, so dass die realen Abmessungen des Teilchens ebenfalls von Einfluss auf seine Beweglichkeit sein werden.

Ideale Kugelkolloide kommen nur in seltenen Fällen vor, dagegen besitzen die meisten Proteinmoleküle ein mehr oder weniger grosses Achsenverhältnis. Ist dieses besonders ungünstig, d.h. weicht die Form sehr stark von derjenigen einer Kugel ab, so wird das Protein unter Umständen eine geringere Beweglichkeit besitzen als ein solches mit kleinerer Ladung, aber günstigeren Abmessungen.

Was schliesslich die *Grösse des Teilchens*, ausgedrückt als dessen Molekulargewicht, anbetrifft, so wirkt diese mit ihrem Anstieg auf die Beweglichkeit im Sinne der Retardierung. Hier ist immerhin zu beachten, dass andere Einflüsse, wie z.B. die Hydratation, Dichte und dgl., ebenfalls im Sinne einer Vergrösserung bzw. einer Aenderung des gegenseitigen Verhältnisses von Proteinen wirken können.

b) Der Einfluss des Lösungsmittels

In den meisten Fällen kommen als Lösungsmittel für Proteine Wasser bzw. wässrige Elektrolytlösungen in Frage.

Während in diesem Abschnitt die Fälle behandelt werden sollen, in denen reines Wasser als Lösungsmittel verwendet werden kann, sollen im Abschnitt c)

die Verhältnisse beleuchtet werden, wie sie durch Zusatz von Fremdionen auftreten.

Die Löslichkeit eines Proteins hängt einerseits von seinen zwischenmolekularen Kräften im Festzustand, andererseits von der Wechselwirkung dieser Kräfte mit den Lösungsmittelmolekülen ab. Je grösser die Gitterenergie im kristallisierten Zustand ist, desto geringer wird die Löslichkeit sein.

Freilich spielen auch andere Faktoren bei der Löslichkeit eine Rolle. Beispielsweise lösen sich Proteine, deren Moleküle beträchtliche Mengen Paraffinseitenketten und Pyrrolidinringe aufweisen und dafür wenig geladene Gruppen enthalten, eher in Alkohol/Wasser-Gemischen als in reinem Wasser, während umgekehrt solche mit wenig unpolaren, aber grossen Mengen geladener Gruppen schon durch geringe Mengen Alkohol oder Aceton aus ihren Lösungen gefällt werden.

Ein Beispiel für den ersterwähnten Fall ist das Gliadin, während z.B. Ovalbumin ein Vertreter der letzteren Gruppe ist.

Aus dem unter a) Gesagten geht ausserdem hervor, dass die Löslichkeit eines Proteins am isoelektrischen Punkte und in dessen Nähe ein Minimum besitzen wird und dass dieselbe je nach der Lage des IEP durch H^+ - bzw. OH^- -Ionen erhöht werden kann. Auch geringe Salzkonzentrationen begünstigen in vielen Fällen die Löslichkeit, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

c) Einfluss von Fremdionen

Wie schon unter b) angedeutet, gibt es Proteine, die in reinem Wasser unlöslich sind, dagegen in verdünnten Elektrolytlösungen in Lösung gebracht werden können.

Solche Proteine, zu denen die Euglobuline gehören, werden ein hohes Dipolmoment und eine hohe Gitterenergie besitzen, so dass sie durch Wasser allein nicht gelöst werden können (*Cohn and Edsall*).

Die hydratisierende Wirkung geringer Salzkonzentrationen, auch «Salting in»-Effekt genannt, bedingt Lösung. Sie wird jedoch bei grossen Elektrolytmengen in ihr Gegenteil verkehrt, so dass Fällung des Proteins aus seiner Lösung erfolgt. In Analogie zum eben erwähnten Ausdruck wird diese Erscheinung mit «Salting out» bezeichnet.

Da die Hydrathülle um die Elektrolytionen um so engmaschiger sein wird, je grösser deren Konzentration, so wird von einer bestimmten Salzkonzentration an Wasser aus der Umgebung des Proteinteilchens zum Aufbau dieses Hydratnetzes herangezogen, so dass das Teilchen dehydratisiert und aus der Lösung verdrängt wird. Es fällt aus (*Greenberg 1951*). Dieser Effekt wird umso grösser sein, je weniger wasserlöslich das Protein ist und je näher beim IEP der Effekt wirksam wird.

Abgesehen von den genannten Bedingungen, ist der Salting out-Effekt sehr stark von der Natur und der Ladung des zugesetzten Elektrolyten abhängig, so dass es ratsam ist, die Menge des Elektrolyten nicht in Konzentrationsmassen

anzugeben, sondern statt dessen den Begriff der «Ionenstärke» zu benutzen, in der die Beziehung zwischen der Konzentration und der Ladung eines Ions zum Ausdruck kommt.

Sie ist durch folgende Beziehung charakterisiert:

$$I = \frac{1}{2} \sqrt{\sum c z^2}$$

worin c die molare Konzentration des Ions und z seine Wertigkeit darstellen.

Die Ionenstärke steht also mit dem Quadrat der Wertigkeit in Beziehung, was zur Folge hat, dass mehrwertige Ionen eine stärker fallende Wirkung besitzen als einwertige.

Daneben besitzen die Elektrolyten als Bestandteile von Pufferlösungen eine grosse Bedeutung für die Festlegung des pH-Wertes des umgebenden Milieus.

Allerdings darf die Ionenstärke nicht zu hoch gewählt werden, da sonst die Wanderung der Proteinteilchen durch zu dichte Ionenwolken behindert wird. Diese Verhältnisse haben sich auch bei unserer Arbeit bestätigt und sollen weiter unten im Detail besprochen werden.

d) Einfluss des Trägermaterials

i. Im Gegensatz zur klassischen Elektrophorese kann in der Papierelektrophorese wegen der dichten Fasertextur des Papiers kein geradliniger Wanderungsweg des Kolloidteilchens angenommen werden. Zwar ergibt die Summe der gekrümmten Einzelstrecken auch eine frontale Wanderung in Richtung der Elektroden, doch sind in diesem Fall die Beweglichkeiten stets geringer, als sie im U-Rohr beobachtet werden.

Ausgehend von den in der freien Elektrophorese herrschenden Verhältnissen, haben *Kunkel* und *Tiselius* (1951) versucht, diese Gesetzmässigkeiten durch entsprechende Umformung auch auf die Papierelektrophorese zu übertragen.

Für die Beweglichkeit u eines Teilchens gilt bei der freien Elektrophorese:

$$u = \frac{v}{H} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ Volt}^{-1}$$

$$v = \text{Geschwindigkeit} = \text{cm sec}^{-1}$$

$$H = \text{Feldstärke} = \text{Volt cm}^{-1}$$

Ersetzt man diese Ausdrücke durch am U-Rohr messbare Werte, so ergibt sich folgende Formel:

$$u = \frac{d l}{t V} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ Volt}^{-1}$$

Darin bedeuten: d = zurückgelegte Strecke des Teilchens
 l = Länge des U-Rohres
 t = Dauer des Elektrophoreseversuchs
 V = Spannung in Volt.

Durch Einführung der spezifischen Leitfähigkeit κ erhält der Ausdruck folgende Form:

$$u = \frac{d \, q \, \kappa}{t \, i},$$

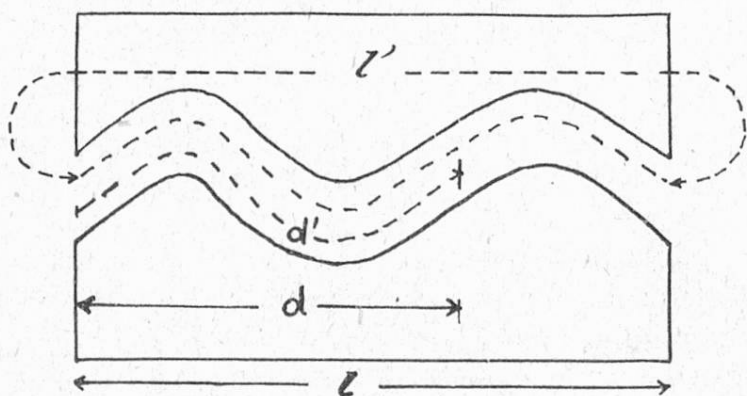
worin q den Querschnitt des U-Rohres und i die Stromstärke darstellen.

Durch Umformung erhält man:

$$d = \frac{u \, t \, i}{q \, \kappa} = \text{Wanderungsstrecke des Teilchens in cm}$$

Durch diese Gleichung wird die Beweglichkeit des Teilchens im U-Rohr der *Tiselius*-Apparatur beherrscht.

Die Beziehung zur Papierelektrophorese wird durch folgende Ueberlegung hergestellt (siehe Zeichnung 1):



$$\frac{d}{d'} = \frac{l}{l'}$$

$$d' = \frac{d \, l'}{l}$$

In Analogie zum Beweglichkeitsausdruck der freien Elektrophorese kann d' aber auch folgendermassen ausgedrückt werden:

$$d' = \frac{u \, t \, i}{q_p \, \kappa},$$

worin q_p dem Querschnitt des Papiers entspricht. Folglich gilt:

$$d = d' \frac{l}{l'} = \frac{u \, t \, i}{q_p \, \kappa} \frac{l}{l'}$$

l/l' stellt den Korrekturfaktor gegenüber der freien Elektrophorese dar und kann aus dem Widerstand R des Papierstreifens berechnet werden.

$$l' = R \, q_p \, \kappa$$

In der folgenden Tabelle 1 sind die Beweglichkeiten u_a von menschlichem Serumalbumin in Veronalpuffer pH 8,8, Ionenstärke 0,1 und verschiedenen Papiersorten, sowie die benutzten Korrekturfaktoren l/l' aufgeführt, mit denen die wahre Beweglichkeit u_e ermittelt wurde (*Lederer* 1955).

Tabelle 1

Papiersorte	u_a	$1/r$	u_c
Munktell 20	$4,01 \pm 0,09$	$0,77 \pm 0,03$	6,78
Ford Fliesspapier	$3,21 \pm 0,12$	$0,70 \pm 0,04$	6,53
S & S 413	$2,34 \pm 0,21$	$0,58 \pm 0,06$	6,85
In freier Elektrophorese			6,43

ii. Eine zweite Erscheinung, welche die papierelektrophoretische Wanderung der Proteinteilchen beeinflusst, ist die *Elektroendosmose*.

Wie schon erwähnt, kommt sie dadurch zustande, dass die Cellulosefaser oft noch geringe Mengen Carboxylgruppen aufweist, wodurch sie gegenüber den meist schwach alkalischen Puffergemischen eine negative Aufladung erfährt. Die stationäre Papierphase wird dadurch keine Veränderung erleiden, wohl wird sich aber der Effekt auf die gegenüber dem Streifen positiv geladene Pufferlösung übertragen, wodurch eine Strömung derselben in Richtung der Kathode entsteht.

Die Folge davon ist, dass die elektroosmotische Strömung der anodischen Wanderung der Proteine entgegengesetzt ist, was sich z.B. darin äussert, dass in den Apparaturen, in denen der Streifen frei auf eine Kante gelegt wird, ein Globulin trotz seiner negativen Aufladung gegen die Kathode wandert (*Wunderly* 1954).

Durch Wahl eines geeigneten sauren Puffers liesse sich diese Erscheinung wahrscheinlich weitgehend eliminieren, doch gestalten sich unter diesen Umständen die Fraktionierungsverhältnisse weitaus ungünstiger.

Kunkel und *Tiselius* (1951) haben eine Korrekturmethode für die Elektroendosmose beschrieben, auf die wir hier nicht näher eintreten.

Immerhin kann mit derselben abgeleitet werden, dass die Endosmose bei feinen, dünnen Papieren weniger zur Geltung kommt als bei Papieren dickerer Textur. Bei Verwendung von Whatman Nr. 1-Papier ist nach *Wunderly* (1954) die Elektroendosmose für die Auftrennung von Proteingemischen nicht von Bedeutung, dagegen wird die Messung der absoluten Wanderungsgeschwindigkeit erschwert.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Streifenenden gleich tief in die Pufferlösung tauchen, da nur auf diese Weise die Heberwirkung und der Sog, die andernfalls durch die kapillare Wirkung des Papiers entstehen, gleich gehalten werden können.

iii. Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Effekt ist die *Evaporation* von Pufferflüssigkeit.

Da der feuchte Papierstreifen einen erheblichen elektrischen Widerstand besitzt, wird je nach der angelegten Spannung mehr oder weniger *Joule'sche*

Wärme entstehen, durch die ein Teil der Flüssigkeit von der Streifenoberfläche verdampft. Es muss somit ständig neue Lösung nachgeliefert werden, so dass sich ein Flüssigkeitsstrom ausbildet, der nach *Machebœuf* (1952, 1953, *Wunderly* 1954) bei den Techniken, in denen der Streifen frei über eine Kante aufgehängt wird, in der Nähe der Pufferbehälter besonders gross ist, um gegen den Scheitelpunkt hin abzunehmen.

Nach *Wunderly* (1954) lässt sich die elektrophoretische Wanderung eines Teilchens unter Berücksichtigung der Elektroendosmose und der Evaporation folgendermassen ausdrücken:

$$v = d - (E_o + E)$$

Es bedeuten: v = beobachtete Wanderungsgeschwindigkeit
 d = Wanderungsstrecke des Teilchens
 E_o = elektroosmotischer Fluss
 E = Evaporation

Wird $d = (E_o + E)$, so gelangt das Protein zum Stillstand.

Diese Erscheinung, auch Elektrorheophorese genannt (*Machebœuf*, *Wunderly*), äussert sich darin, dass der endgültig erreichte Platz eines Teilchens unabhängig von seiner Auftragsstelle ist, eine Beobachtung, die wir im Laufe unserer Untersuchungen gleichfalls bestätigt fanden.

Der Einfluss der Aussentemperatur sowie der Stromdichte (Milliamp./cm²) auf die Verdampfung des Wassers ist in der Tabelle 2 wiedergegeben (*Wunderly* 1954).

Tabelle 2

Stromdichte	Evaporation pro Stunde bei			
	6°	20°	6°	20°
	mg H ₂ O pro Streifen		mg H ₂ O pro cm ² /Stunde	
0	11	11	0,12	0,12
0,25	56	80	0,63	0,91
0,50	225	270	2,57	3,09
1,00		730		8,33

Sofern bei Zimmertemperatur gearbeitet wird, sollte demnach die Stromdichte möglichst niedrig gehalten werden.

3. Anwendung der allgemeinen Gesetzmässigkeiten auf die Proteine des Eiklars

Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich aus den soeben skizzierten theoretischen Betrachtungen praktische Folgerungen für die papierelektrophoretische Auftrennung der Proteine des Eiklars ziehen lassen.

a) Ladung, Grösse und Form der Teilchen

i. Ladung und isoelektrischer Punkt

Wie alle Eiweissstoffe, sind auch die Proteine des Eiklars Kolloidteilchen von amphoterem Charakter, deren nach aussen wirksame Nettoladung von der im Molekül vorhandenen Anzahl freier, dissoziierbarer Gruppen abhängt (siehe Seite 83).

Den pH-Wert, bei dem die Nettoladung eines Proteins gleich Null wird, bezeichnet man, wie erwähnt, als isoelektrischen Punkt (IEP). Je nachdem, ob dieser sich im sauren oder alkalischen pH-Gebiet befindet, wird das Protein einen wirksamen Ueberschuss an sauren oder basischen Gruppen besitzen. Bei pH 7,0, in Wasser gelöst, wird somit im ersteren Fall das Teilchen als negativ geladenes Anion vorliegen, im letzteren Fall dagegen als positiv geladenes Kation.

Für die Proteinfraktionen des Eiklars wurden von verschiedenen Autoren die folgenden IEP ermittelt (Advances 1951), wobei die Tabelle nach steigendem pH-Wert geordnet ist.

Tabelle 3
IEP der hauptsächlichsten Eiklarfraktionen

	pH
Ovomucoid	3,9
	4,3
	4,5
Ovalbumin	4,6– 4,8
Globulin	5,6
	6,0
Conalbumin	5,8
	6,0
Lysozym	10,5–11,0

Aus der Tabelle geht hervor, dass mit Ausnahme des Lysozym der IEP aller Eiklarfraktionen im sauren pH-Gebiet liegt und dass folglich die Teilchen in einem neutralen Lösungsmittel als Anionen vorliegen.

Eng verbunden mit diesen Ueberlegungen ist die Wahl eines für die Fraktionierung günstigen Puffers. Dessen pH sollte nach Möglichkeit solche Werte besitzen, dass alle im Puffergemisch gelösten Proteinfraktionen gleiches Vorzeichen der Nettoladung besitzen.

Da sich der oben skizzierte Idealfall kaum realisieren lässt, müssen Pufferlösungen verwendet werden, in deren pH-Bereich wenigstens die grösstmögliche Anzahl der Proteine des Eiklars gleichsinnige Nettoladung besitzt.

Ausgehend von den angeführten IEP, wird vermutlich ein schwach alkalischer Puffer am vorteilhaftesten sein, da auf diese Weise grobe Eingriffe in die

Feinstruktur vermieden werden und trotzdem mit Ausnahme des Lysozyms alle Fraktionen als Anionen vorliegen und eine deutliche Wanderungstendenz zeigen werden.

Solche Pufferlösungen sind z.B. die verschiedenen Veronal- bzw. Veronal-Acetatpuffer vom pH 8—9 und verschiedenen Ionenstärken, sowie Boraxpuffer vom pH 8—9 und verschiedenen Ionenstärken.

Wäre der IEP der einzige ausschlaggebende Faktor zur optimalen Auftrennung des Eiklars, so würde das Conalbumin die geringste negative Nettoladung und Wanderungsstrecke in Richtung der Anode besitzen, unmittelbar gefolgt vom Globulin. Dem Albumin käme eine noch grössere Wanderungsstrecke zu, während das Ovomuroid am weitesten gegen die Anode wandern sollte.

Neben diesem zwar wichtigen Kriterium wird jedoch die Fraktionierung des Eiklars noch von einer Reihe anderer Faktoren beeinflusst, deren Ursachen grossenteils im Proteinmolekül selbst zu suchen sind und die in der Folge untersucht werden sollen.

ii. Es sei zunächst die *Grösse der Proteinteilchen* betrachtet.

In der folgenden Tabelle 4 wird eine Uebersicht über die Molekulargewichte der verschiedenen Fraktionen des Eiklars gegeben (Advances 1951), wobei sie nach zunehmender Grösse geordnet sind.

Tabelle 4
Molekulargewichte der Proteinfractionen des Eiklars

Lysozym	14–17 000
Ovomuroid	27–28 500
Ovalbumin	37–46 000
Conalbumin	70–87 000
Globulin	keine Angaben in Literatur, vermutlich über 90 000.

Für die Globulinfraktion konnte keine Angabe der Molekulargrösse in der Literatur gefunden werden. Da jedoch feststeht, dass es sich um Euglobuline handelt, so könnte, in Analogie zu vielen anderen Globulinen, ein relativ hohes Molekulargewicht angenommen werden. So besitzt beispielsweise die Lactoglobulinfraktion der Kuhmilch (nicht zu verwechseln mit dem β -Lactoglobulin, bei dem es sich um ein Pseudoglobulin handelt) ein Molekulargewicht von 180 000, das Globulin des Colostrums der Kuh ein solches von 160 000 bis 190 000 (Greenberg 1951). Andererseits wird für menschliches β_1 -Globulin ein Molekulargewicht von 90 000 angegeben.

Wie schon dargelegt, wirkt die Grösse der Teilchen auf deren Beweglichkeit retardierend.

Wird also nur die Grösse der Teilchen als bestimmend betrachtet, so sollten bei Verwendung des erwähnten Puffers die Fraktionen in der oben angeführten Reihenfolge wandern, wobei sich Ovomuroid am schnellsten, die Globulinfraktion am langsamsten bewegen würde.

iii. Molekülbau und Form

Doch ist nicht nur das Molekulargewicht, sondern auch der Molekülbau und die Form des Moleküls von Einfluss auf die Auftrennung. Kugelförmige Teilchen, bei denen die Ladungen möglichst gleichförmig im Molekül verteilt sind, werden besser und rascher wandern als solche, die eine langgestreckte Form besitzen oder bei denen die Ladungen ungleichmässig im Molekül angeordnet sind.

1. Da das *Ovalbumin* ein typischer Vertreter des erstgenannten Falles ist, so muss es relativ günstige Wanderungsverhältnisse aufweisen.
2. Das *Conalbumin* ist ebenfalls ein typisches Albumin, dessen IEP und relativ hohes Molekulargewicht jedoch eine im Vergleich zum Ovalbumin wesentlich geringere Wanderungstendenz erwarten lassen.
3. Nimmt man für die *Globuline* ein hypothetisches Molekulargewicht von ca. 100 000 und eine ellipsoide Gestalt an, so wird sich in Verbindung mit ihrem IEP eine Wanderungstendenz ergeben, die sich kaum von derjenigen des Conalbumins unterscheidet.
4. Die Lage seines IEP und das niedrige Molekulargewicht des *Ovomucoids* würden eine schnelle Wanderung in Richtung der Anode erwarten lassen.

iiii. Folgerungen

Forsythe und *Foster* (1950) haben mit Hilfe der klassischen Elektrophorese die Beweglichkeiten der Eiklarproteine bei pH 7,8 bestimmt und stellten eine Reihenfolge der Wanderung fest, die wir bei unseren papierelektrophoretischen Versuchen auch erzielt haben. Während sich die Beweglichkeiten des Albumins, Conalbumins und Globulins qualitativ mit obigen Ueberlegungen decken, herrscht beim Ovomuroid eine ziemliche Diskrepanz zwischen theoretisch zu erwartender Wanderungstendenz und tatsächlich beobachteter Beweglichkeit.

In der folgenden Tabelle 5 sind neben den mit der klassischen Elektrophorese (*Forsythe* und *Foster* 1950) und der Papierelektrophorese beobachteten Beweglichkeiten auch die Molekulargewichte der einzelnen Fraktionen sowie die pH-Differenzen zwischen ihren IEP und Veronal-Acetatpuffer vom pH 8,6 aufgeführt. Bezogen auf eine mittlere Wanderungsstrecke wurde je nach Grad des vermutlichen Einflusses auf die Wanderung eine Bewertung vorgenommen, die sich von (++) für den günstigsten Fall bis (—) für die am langsamsten wandernde Fraktion erstreckte.

Theoretisch sollte das Ovomuroid die grösste Beweglichkeit aufweisen, gefolgt vom Ovalbumin, während beim Globulin und Conalbumin die geringste

Tabelle 5

	Beweglichkeiten		Molekulargewicht	pH-Differenz Puffer-IEP	Summe
	*)	**)			
Conalbumin	—2,41	0,51	80 000	ca. 2,6	— — —
Globulin	—3,30	0,59	100 000	ca. 3,0	— — —
Ovomucoid	—4,16	0,66	28 000	ca. 4,5	+
Ovalbumin	—5,88	0,86	44 000	ca. 4,0	+
			+	+	+

*) Werte des aufsteigenden Schlierendiagramms, ausgedrückt als $u = \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot 10^{-5}$.

**) Von uns beobachtete papierelektrophoretische Wanderung, bezogen auf eine Gesamtlänge des Extinktionsdiagramms = 1.

Beweglichkeit zu erwarten wäre. Die grobe Bewertung der Tabelle zeigt für diese zwei Proteine keine Unterschiede. Es dürfte aber der pH-Differenz grösseres Gewicht als dem relativ geringen Unterschied im Molekulargewicht zukommen.

Die Reihenfolge: Ovalbumin – Globulin – Conalbumin ist also erklärlich.

Auffallend ist dagegen der grosse Unterschied zwischen theoretisch förderlichen Wanderungseigenschaften des Ovomucoids und seiner praktisch beobachteten geringen Beweglichkeit.

Es ist dies ein Zeichen dafür, dass ausser den zweifellos wichtigen Eigenschaften der Nettoladung und des Molekulargewichts auch noch andere Kräfte im Spiel sind, die verzögernd auf die Wanderung des Ovomucoids einwirken, wie schon auf Seite 83 angedeutet wurde.

Schon die Form des Teilchens (Achsenverhältnis 1 : 6,3 *Fredericq* und *Deutsch* 1949) weicht deutlich von derjenigen des Ovalbumins (Achsenverhältnis 1 : 3,9) ab. Immerhin dürfte sie kaum entscheidend sein.

Da jedoch sein Gehalt an Kohlehydraten 26 % des Molekulargewichts ausmacht und nach *Pedersen* und *MacFarland* (1940, zitiert bei *Longworth* 1940) kohlehydratreiche Proteine Tendenz zur Komplexbildung mit anderen Proteinen zeigen, so besteht die Möglichkeit, dass auf diese Weise die Beweglichkeit herabgedrückt wird. Der hohe Gehalt an Kohlehydrat ist möglicherweise auch eine der Ursachen für die ungewöhnliche Stabilität dieses Proteins, das durch Hitze nicht koaguliert wird, keine Fällung durch Trichloressigsäure erfährt und das für die antitryptischen Eigenschaften des Eiklars verantwortlich ist.

Ueber die Ladungsverteilung im Ovomucoidmolekül konnten keine Angaben gefunden werden, doch könnte eine ungleichmässige Anordnung der Ladungen gleichfalls eine verzögernde Wirkung auf die Wanderungsgeschwindigkeit haben.

b) Einfluss des Lösungsmittels

Wie aus den obigen Tabellen hervorgeht, setzt sich Eiklar aus 2 Albuminen, Globulinen, Ovomuroid und Ovomucin zusammen.

Während Albumin und Conalbumin, sowie das Ovomuroid in reinem Wasser leicht löslich sind, ist dies bei den Globulinen und beim Ovomucin nicht der Fall, so dass aus diesem Grunde Wasser als Lösungsmittel nicht in Frage kommen konnte.

Da die Papierelektrophorese im wesentlichen auf der Leitfähigkeit von Flüssigkeiten beruht, wobei die Verbindung zwischen Anode und Kathode durch den feuchten Papierstreifen hergestellt wird, so ist auch aus diesem Grunde reines Wasser für die Versuche nicht geeignet. Erst verdünnte Salzlösungen in Form der verschiedenen Puffergemische vermögen die nötigen Stromdichten für eine gute Auftrennung der einzelnen Fraktionen zu erzeugen.

c) Einfluss der Fremdionen

Aus dem unter b) Gesagten stellt sich damit die Frage nach einem geeigneten Lösungsmittel für das Eiklar, sowie nach einem möglichst günstigen Puffergemisch.

Die Ausführungen unter a) liessen erkennen, dass der pH-Wert der zur Verwendung gelangenden Pufferlösungen qualitativ schon einigermaßen aus den IEP der einzelnen Bestandteile abgeleitet werden kann.

Mindestens ebenso wichtig ist jedoch auch die Salzkonzentration der Lösungen, d.h. ihre Ionenstärke.

Wie schon erwähnt, bilden sich bei Anwesenheit von Fremdionen um die einzelnen Proteinteilchen Ionenwolken von entgegengesetzter Wanderungsrichtung wie die Proteinkolloide. Je höher die Ionenstärke, desto grösser wird auch dieser bremsende Effekt auf die Wanderung der Eiklarproteine sein.

Vermutlich wird jedoch auch in dieser Hinsicht die Wirkung auf die einzelnen Fraktionen nicht gleich gross sein, sondern die Bremswirkung wird ausserdem noch von der Grösse und der Form des Teilchens abhängen.

Da bestimmte Pufferlösungen als Leitfähigkeitsvermittler in den Puffertrögen der Elektrophoresewanne benutzt werden, wird auch die Stromstärke und die gebildete Stromwärme von der Ionenstärke abhängen. Da die Stromwärme mit dem Quadrat der Stromstärke wächst, liegt es auf der Hand, dass auch aus diesem Grund die Ionenstärke nicht zu hoch gewählt werden darf. Die direkte Folge der Stromwärme ist, wie erwähnt, die Verdunstung des Lösungsmittels vom Streifen, so dass auf ihm eine zusätzliche Konzentrierung von Fremdionen stattfindet, die natürlich die Wanderung der Eiklarproteine noch weiterhin erschwert. In Extremfällen kann sie zur regelrechten Bildung von Salzkrusten führen. Hierbei könnte sogar die Fällung der Proteine einsetzen, was eine Störung des Vorganges bedeuten müsste.

Wie weiter unten mitgeteilt wird, haben wir für unsere Versuche Eiklar nicht im verwendeten Puffergemisch gelöst, sondern mit 10%iger NaCl-Lösung verdünnt, was einer Molarität von 1,71 entspricht. In dieser Lösung, die mit einigen Tropfen 0,1n NaOH auf pH 8,62 eingestellt worden war (Glaselektrode «Polymetron»), wurde das Eiklar im Verhältnis 1 : 5 gemischt, wobei sich mit Ausnahme des Mucins alle Bestandteile gut lösten. Wurde 0,01 ml dieser Eiklarlösung auf den mit Pufferlösung getränkten Elektrophoresestreifen aufgetragen, so war diese Menge im Verhältnis zur umgebenden Flüssigkeit so gering, dass sich schon nach kurzer Zeit ein Konzentrationsausgleich eingestellt haben musste.

Trotz der hohen NaCl-Konzentration konnte beispielsweise eine Ausfällung der Globuline nicht beobachtet werden, so dass diese Verdünnungsmethode beibehalten werden konnte.

Wurden alle bisher angeführten Faktoren berücksichtigt, so war zu erwarten, dass mit einem Puffergemisch der Ionenstärke 0,05—0,1 im pH-Bereich 8—9 befriedigende Fraktioniererfolge erzielt werden sollten; es wären das etwa ähnliche Verhältnisse, wie sie für die Fraktionierung der Serumproteine angewandt werden.

d) Einfluss der Papiersorte

Abgesehen von einigen allgemeinen Gesetzmässigkeiten, liessen sich für die Wahl einer Papiersorte keine exakten Richtlinien aufstellen. Jedenfalls haben wir für die Fraktionierung der Eiklarproteine bessere Erfolge mit Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043b (glatte Oberfläche) erzielt als mit dem sonst meist verwendeten Whatman Nr. 1-Papier. Bei den Eigelbproteinen lagen die Verhältnisse umgekehrt, da dort die Fraktionierung am besten auf Whatman Nr. 1-Papier gelang.

e) Der Elektroendosmose

soll bei Whatman-Papieren kein Einfluss auf die Fraktionierung zukommen (Wunderly 1954), und auch während unserer Arbeiten konnten wir an den Eiklarproteinen keine Umkehrung der Wanderungsrichtung durch endosmotische Effekte feststellen, unter der Voraussetzung, dass die Proteinlösung an der Kathode aufgetragen wurde. Wir gehen darum auf diesen Effekt nicht weiter ein.

Zusammenfassend sollten sich günstige Bedingungen für die Elektrophorese bei folgender Anordnung ergeben:

1. Puffergemisch: etwa pH 8,5
Ionenstärke = 0,05–0,1
ein Veronal-Acetatpuffer würde diesen Bedingungen entsprechen.
2. Papiersorte: Prüfung der Sorten von Fall zu Fall. Immerhin ist Papieren mit einem Mindestmass an freien COOH-Gruppen (Linterspapieren) sowie einer hohen Nassfestigkeit und dichter Fasertextur der Vorrang zu geben.

3. Spannungsdichte: Um die Erwärmung des Streifens nach Möglichkeit herabzudrücken und andererseits doch scharfe Proteinbänder zu erhalten, erschien eine mittlere Spannung (100 bis maximal 250 Volt) bei nicht zu langer Versuchsdauer (etwa 8–9 Stunden) als vorteilhaft.

II. Teil

Die Chemie der Eierproteine

A. Eiklar

1. Chemische Zusammensetzung

Das Eiklar ist eine durchsichtige, leicht gelblich gefärbte, ziemlich viskose Flüssigkeit. Allerdings rührt ihre Viskosität zum grössten Teil von der sie durchdringenden, feinen Mucinstruktur her. Wird dieselbe durch Schlagen zerstört, so sinkt damit auch die Zähflüssigkeit des Weisseies beträchtlich.

In der folgenden Tabelle sind die Hauptbestandteile des Eiklars aufgeführt, wie sie sich durch die chemische Analyse ergeben (Handbuch der Lebensmittelchemie 3. Band 1936).

Tabelle 6
Zusammensetzung von Eiklar

Wassergehalt	88,40 % (87,35-89,20 %)
Trockensubstanz	11,60 % (10,80-12,65 %)
Proteingehalt (N×6,25)	10,80 % (10,30-11,30 %)
Fett	0,25 %
Glucose	0,45 %
Asche	0,67 %

2. Die Proteinbestandteile des Eiklars

Während im Eigelb neben den Proteinen auch ein ziemlich hoher Prozentsatz ätherlöslicher Bestandteile, wie Eieröl, Phosphatide, Cholesterin und Farbstoffe, enthalten ist, besteht die Trockensubstanz des Eiklars fast ausschliesslich aus Proteinen.

Bei den ersten Untersuchungen vor gut 100 Jahren wurde das Eiklar als ein einheitliches Protein betrachtet, doch schon bald führten Hitzekoagulierung, sowie Fraktionier- und Fällungsversuche mit Alkohol und Salzlösungen zu der Erkenntnis, dass seine Zusammensetzung heterogen ist, wobei die einzelnen Fraktionen recht verschiedene Eigenschaften besitzen.

Die Anwendung der klassischen Elektrophorese führte schliesslich zu der Erkenntnis, dass die Zusammensetzung der Eiklarproteine noch feinere Diffe-

renzierungen aufweist, als es die Ergebnisse der Fraktionierungen erwarten liessen, die durch die klassischen Fällungs- und Aussalzmethoden erzielt worden waren.

In der folgenden Tabelle 7 sind die Ergebnisse der elektrophoretischen Fraktionierung von Eiklar aufgeführt, wie sie von verschiedenen Forschern beobachtet wurden. Zum Vergleich sind in der letzten Spalte die Werte aufgeführt, die *Sörensen* (1934) bei der chemischen Fraktionierung von Eiklar durch Ausfällung und Abtrennung der Einzelbestandteile erhielt.

Tabelle 7
Zusammensetzung der Eiklarproteine

	Elektrophorese				Salzfällung
	<i>Longworth</i> (1940)	<i>Bain</i> (1947)	<i>Forsythe</i> (1950)	<i>Csonka</i> (1952)	<i>Sörensen</i> (1934)
Ovalbumin	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
A ₁		52,0	54,1		
A ₂		8,5	13,8		
A ₁ + A ₂	60,0	60,5	67,9	58,9	69,7
Conalbumin					
C ₁		6,5			
C ₂		16,0			
C ₁ + C ₂	13,8	22,5	14,2	13,2	9,0
Ovomucoid	14,0		9,5	14,9	12,7
Globulin					
G ₁	2,8				
G ₂	4,6				
G ₃	4,3				
G ₁ + G ₂ + G ₃	11,7	15,0	9,0	13,1	6,7
Ovomucin	da unlöslich, bisher keine elektrophoretischen Auftrennungen geglückt				1,9

Wenn auch die Elektrophorese im Vergleich zu den chemischen Isoliermethoden den heterogenen Charakter der Einzelkomponenten stärker hervortreten lässt, so muss einschränkend gesagt werden, dass wirklich definierte Unterschiede, z.B. in serologischer Hinsicht, nur an den Unterfraktionen 1, 2 und 3 des Globulins beobachtet werden konnten.

a) Ovalbumin

Es ist ein typisches Albumin, löslich in Wasser und verdünnten Salzlösungen. Durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat wird es nicht gefällt, dagegen schon durch geringe Mengen Alkohol oder Aceton.

Für sein Molekulargewicht und seinen IEP werden folgende Werte angegeben (Advances 1951):

Molekulargewicht = 37 000 — 46 000 Hauptteil um 44 000
IEP = pH 4,6 — 4,8

Die Unterfraktionen A₁ und A₂, die mittelst der freien Elektrophorese beobachtet wurden, unterscheiden sich hauptsächlich in ihren Beweglichkeiten, die ihrerseits wieder vom umgebenden pH abhängen.

Einen bestimmten chemischen Unterschied zwischen den beiden Albuminfraktionen glauben manche Autoren im verschiedenen Phosphorgehalt von A₁ und A₂ zu erblicken (*Linderström-Lang* und *Ottesen* 1949, *Perlman* 1950).

Unter Annahme eines Molekulargewichtes von 45 000 berechneten diese Forscher für A₁ einen Gehalt von 2 Äquivalenten Phosphorsäure pro Molekulargewicht Albumin, während dem A₂ nur 1 Äquivalent Phosphorsäure entspräche.

Ob zwischen den beiden Modifikationen noch weitere, signifikante Unterschiede bestehen, kann erst entschieden werden, wenn beide Formen in getrenntem Zustand rein dargestellt worden sind, was bisher noch nicht gelungen ist.

b) Conalbumin

Zwar ist auch das Conalbumin ein Albumin, doch weicht es in seinem Molekulargewicht und IEP erheblich vom Ovalbumin ab.

Molekulargewicht = 70 000 — 87 000
IEP = pH 5,8 (C₁)
pH 6,0 (C₂)

Während im frischen, nativen Eiklar nur eine Conalbuminkomponente auftritt, die dem Anteil C₁ entspricht, konnte durch elektrophoretische Untersuchungen gezeigt werden, dass im pH-Gebiet 8,0 und 3,95 die beiden Komponenten C₁ und C₂ auftraten (*Longsworth* 1940). Wurden die Versuche bei pH 3,92 durchgeführt, so wurde nur die Fraktion C₂ erhalten. Durch Dialyse dieser verdünnten Conalbuminlösung gegen Pufferlösungen höheren pH-Wertes konnte der Gehalt an C₁ stetig vergrößert werden, so dass beim pH 7,54 nur noch ein geringer Prozentsatz C₂ vorhanden war.

Nach *Longsworth* (1940) scheint deshalb C₂ die unterhalb pH 4,0 stabile Form zu sein, während oberhalb davon C₁ die stabile Modifikation ist.

c) Ovomucoid

Die gegen äussere Einflüsse widerstandsfähigste Fraktion des Eiklars ist das Ovomucoid, das auch der Sitz der antitryptischen Eigenschaften des Eiklars ist.

Das Molekulargewicht und der IEP bewegen sich in folgenden Grössenordnungen:

Molekulargewicht = 27 000 — 28 500
IEP = pH 3,9 — 4,5

Wie aus der Bezeichnung hervorgeht, handelt es sich um ein Glykoprotein, dessen Kohlehydratanteil 26 % vom Molekulargewicht ausmacht und sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzt (*Fredericq und Deutsch 1949*):

Glucosamin	= 17 %
Mannose	= 9 — 9,7 %

Durch Hitze wird es nicht koaguliert, desgleichen nicht durch Trichloressigsäure gefällt. Im Gegensatz zum Albumin und Conalbumin ist es in höheren Alkohol- oder Ammoniumsulfatkonzentrationen löslich, als es bei jenen der Fall ist.

d) *Ovoglobulin*

Es ist dies die bisher einzige Fraktion des Eiklars, deren Unterfraktionen auch in chemischer und biochemischer Hinsicht unterschiedliches Verhalten zeigen.

So erwies sich G₁ identisch mit dem bakteriolytischen Bestandteil *Lysozym*, der auch in kristallisierter Form erhalten wurde (*Alderton 1945*).

Im Folgenden sind dessen Molekulargewicht und IEP aufgeführt:

Molekulargewicht	= 14 000 — 17 000
IEP	= pH 10,5 — 11,0

Die Globulinbestandteile G₂ und G₃ sind bisher noch ungenügend charakterisiert, doch handelt es sich bei ihnen um Euglobuline, die folgende IEP besitzen:

pH 6,0 (G ₂)
pH 5,6 (G ₃)

Molekulargewichte für G₂ und G₃ konnten in der Literatur nicht gefunden werden, so dass hier noch eine Lücke zu bestehen scheint.

e) *Ovomucin*

Wegen seiner Unlöslichkeit ist dem Ovomucin unter den Proteinfractionen des Eiklars bisher die geringste Aufmerksamkeit geschenkt worden.

Nach *Lanni (1949)* ist Ovomucin höchstwahrscheinlich identisch mit dem Inhibitor der durch Influenza-Virus verursachten Blutgerinnung («influenza virus hemagglutination»), für den der Forscher aus Sedimentationskonstanten und Viskositätsmengen ein Molekulargewicht von 7 600 000 berechnete. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass das Molekül Faserstruktur besitzt, was auch mit den Beobachtungen am Eiklar in Einklang steht, wo die Proteine von einem feinen Netz von Mucinfasern durchsetzt sind. Dieses Netz kann durch Schlagen zerstört werden.

Wie alle Mucine, so enthält auch das Ovomucin bestimmte Mengen von Kohlehydraten.

Young (1937) berichtet über einen Gehalt an Glucosamin von 11,0 %, während *Lanni* und Mitarbeiter (1949) einen Glucosegehalt von 10,3 % anführen.

B. Eigelb

1. Chemische Zusammensetzung

Das Eigelb macht 30 % des Frischgewichtes des Gesamteies und 34 % des Eiinhaltes aus (Handbuch der Lebensmittelchemie 3. Band 1936).

Im Gegensatz zum flüssigen Eiklar ist das Eigelb von einer dünnen Membran umgeben, so dass sich auf diese Weise der charakteristische, mehr oder weniger gelbe Dotter scharf vom Eiklar abhebt. Erst nach Zerstörung dieser Membran fließt das Eigelb aus, doch nicht wie das Eiklar als eine viskose, aber ziemlich klare Flüssigkeit, sondern als dünnflüssige, opake, gelbe Fett- bzw. Oelemulsion.

Die chemische Zusammensetzung des Eigelbs ist in der Tabelle 8 aufgeführt (Handbuch der Lebensmittelchemie 3. Band 1936, Schweiz. Lebensmittelbuch 1937, *König* 1914, 1919, *Beythien* 1914).

Tabelle 8

	Frisches Eigelb	Trockensubstanz
	0/0	0/0
Wassergehalt	49,4 (50,9)	
Trockensubstanz	50,6 (49,1)	
Protein (N×6,25)	16,3	32,0
Fettsubstanz	31,9	64,7
Reduzierende Stoffe (als Lactose berechnet)	0,3	
N-freie Extraktstoffe		0,8
Asche	1,0	2,3

2. Die Proteinbestandteile des Eigelbs

Im Gegensatz zu den Proteinen des Eiklars ist die Erforschung der Eigelbproteine noch ziemlich lückenhaft.

Die bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse sind in der folgenden Tabelle 9 zusammengefasst (*Advances* 1951, *Osborne* 1900, *Chargaff* 1942, *Alderton* 1945, *Fevold* 1946).

Tabelle 9
Proteine des Eigelbs
(als % der Trockensubstanz)

Protein	Gehalt	Klassifizierung	Zusammensetzung
Lipovitellin	^o / _o 17–18	Lipoproteid	Phospholipoid + Vitellin
Lipovitellinin	12–13	Lipoproteid	Phospholipoid + Vitellinin
Livetin	4– 5	Pseudoglobulin	3 Komponenten
Phosvitin	6	Phosphoproteid	10,0 % P

Mit Ausnahme des Livetins enthalten alle oben angeführten Fraktionen gewisse Mengen Phosphorsäure, die über die Hydroxy-Aminosäuren Serin und Threonin esterartig an das Protein gebunden ist. Es handelt sich somit um Eiweiss-Substanzen, die im deutschen Sprachgebiet als «Proteide» — in diesem Fall Phosphoproteide — bezeichnet werden, während in der angelsächsischen Literatur hierfür meist der Ausdruck «conjugated proteins» benutzt wird. In Analogie hierzu können Lipovitellin und Lipovitellinin als Lipoproteide betrachtet werden.

Die einzelnen Fraktionen wurden durch Extraktion des Eigelbs mit Aether erhalten, wobei die lipoidhaltigen Anteile in Lösung gingen, während die wasserlöslichen Proteine abzentrifugiert, der Niederschlag in Wasser gelöst und daraus das Livetin durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat gefällt wurde.

Vitellin und Vitellinin sind im Eigelb an Phosphatide gebunden, weshalb sie in Wasser zwar unlöslich, in Salzlösungen jedoch nur zu milchigen Emulsionen dispergierbar sind.

Von den aufgeführten Fraktionen ist einzig das Livetin vollständig wasserlöslich. In dieser Fraktion soll der grösste Teil der Enzyme des Eigelbs enthalten sein (*Lineweaver* 1947).

Vitellin und Vitellinin besitzen nach dem heutigen Stand ihrer Erforschung dieselben Eigenschaften und unterscheiden sich lediglich im Phosphorgehalt, der im Vitellin etwa drei- bis viermal so hoch ist wie im Vitellinin.

Aus peptischen und tryptischen Abbauversuchen am Vitellin erhielten *Blackwood* und *Wishart* (1934, *Advances* 1951) 2 definierte Bruchstücke mit je 23 und 73 % des Gesamtphosphorgehaltes. Es ist dies fast dasselbe Verhältnis der Phosphorgehalte, wie es für die Einzelbestandteile Vitellin und Vitellinin gefunden wird, so dass die Hypothese nicht von der Hand zu weisen ist, dass beide Fraktionen Bruchstücke einer grösseren Fraktion darstellen, die den Phosphor an zwei verschiedenen Stellen des Moleküls gebunden enthält.

Durch Verdauungsversuche erhielten *Swigel* und *Posternak* (1927, *Advances* 1951) drei Bruchstücke, die sie mit Ovotyrin α , β , γ bezeichneten. Das Ovotyrin

erwies sich dabei identisch mit der sog. Vitellinsäure (vitellenic acid), die schon frühzeitig (Levene 1900, 1906) durch Extraktion des Vitellins mit 12%igem Ammoniak erhalten wurde und die sich durch hohen Phosphorgehalt auszeichnete.

Bemerkenswert war der hohe Gehalt an l-Sterin im Ovotyrin β , so dass die Annahme besteht, dass Serinphosphorsäure der hauptsächliche Phosphorbestandteil des Vitellins ist.

Mecham und Olcott (1948, 1950) haben über die Isolierung eines weiteren Phosphoproteids berichtet, das die Forscher durch Extraktion von Lipoproteidrückständen erhalten haben und das sie als Phosvitin bezeichneten. Der Phosphorgehalt ist beträchtlich (siehe Tabelle 10), und auch der Seringehalt ist sehr hoch, so dass grosse Ähnlichkeit zwischen Phosvitin und Vitellinsäure besteht.

Tabelle 10
Vergleich zwischen Phosvitin und Vitellinsäure

	% N	% P	% Fe	% S	N / P
Phosvitin	11,9	9,7–10	0,4	0,1	2,5–2,9/1
Vitellinsäure	13,13	9,88	0,5	Spuren	2,94/1

Auch in der Zusammensetzung der Aminosäuren sind beide Proteine weitgehend identisch, so in der Abwesenheit von Cystin und Cystein, Methionin, Tryptophan und Tyrosin, sowie in dem sehr hohen Gehalt an Serin (33 %, Advances 1951), woraus sich die mögliche Identität der beiden Substanzen ergibt.

Young und Phinney (1951) haben versucht, Eigelb mittelst der klassischen Elektrophorese zu fraktionieren und erhielten Schlierendiagramme, die 3 Gipfel aufwiesen, welche von ihnen mit α , β und γ bezeichnet wurden. Die am langsamsten wandernde Fraktion γ entspricht hierbei 85,1 % des Proteins, während die Fraktionen α und β 4,6 bzw. 10,2 % davon ausmachen. Die Autoren deuten aus diesen Werten die γ -Fraktion als Lipovitellin (+Lipovitellin), während der β -Gipfel dem Livetin und die am schnellsten wandernde α -Fraktion dem Phosvitin zugeordnet wurden. Zum Beweis dieser Annahme müssten jedoch die Bestandteile erst in reinem Zustand dargestellt werden.

Nach Shepard und Hottle (1949) besteht die wasserlösliche Livetinfraction aus 3 Unterfraktionen, die elektrophoretisch getrennt werden können und deren Beweglichkeiten mit -7, -4,4 und -2, alle $\cdot 10^{-5}$, angegeben sind. Allerdings wird diese Behauptung von Young (1951) bestritten, der das Auftreten dreier Livetinfractionen auf Verunreinigungen zurückführt.

Unter Berücksichtigung der eben geschilderten Eigenschaften der Eigelbproteine erschien es unsicher, ob auf papierelektrophoretischem Wege eine gute Fraktionierung in die Einzelbestandteile zu erzielen sein würde.

In späteren Abschnitten dieser Arbeit wird jedoch gezeigt, dass eine papierelektrophoretische Fraktionierung des Eigelbs in 5 Komponenten recht gut gelingt, wobei durch spezielle Färbemethoden nachgewiesen werden kann, dass die Lipoproteine den am langsamsten wandernden Fraktionen entsprechen.

III. Experimenteller Teil

So zahlreich die Untersuchungen der Serumproteine unter Anwendung papierelektrophoretischer Methoden auch sind, so konnten in der Literatur keine Hinweise über systematische Fraktionierungsversuche an Eiklar bzw. Eigelb mittelst der Papierelektrophorese gefunden werden. Lediglich in der Arbeit von *Michl* (1952, *Turba* 1954 und *Lederer* 1955) fand sich ein kurzer Hinweis über die Auftrennung von Hühnereiklar, wobei es dem Autor allerdings nur darum ging, eine von ihm entwickelte neue Auswertungsmethode zu demonstrieren. Als unsere Arbeiten schon ziemlich weit fortgeschritten waren und zu guten Ergebnissen geführt hatten, stiessen wir im Werk von *Lederer* (1955) auf kurze Angaben über Fraktionierungsversuche an Eiklar, die vom Autor durchgeführt, aber noch nicht veröffentlicht worden waren. Ein weiterer Hinweis fand sich in einer Veröffentlichung von *Kaminsky* (1954), in der immunochemische Studien an Eiklar beschrieben werden, in deren Verlauf neben der klassischen Elektrophorese und der Elektrophorese in Gelatine auch kurz die Verwendung der Papierelektrophorese zur Auftrennung der Ovoglobuline beschrieben wird. Keine der zitierten Arbeiten zeigte genügende Details, die eine direkte Anwendung auf das uns gestellte Problem gestattet hätten, so dass eingehende experimentelle Vorarbeiten notwendig wurden.

A. Ermittlung der günstigsten Versuchsbedingungen zur papierelektrophoretischen Fraktionierung von Eiklar

Nach den Ausführungen in Teil I konnten folgende Faktoren von Einfluss auf die Ergebnisse der papierelektrophoretischen Fraktionierung des Eiklars sein:

1. Verdünnung des Eiklars
2. Wahl der Pufferlösung
3. Wahl der Papiersorte
4. Auftragen der Eiklarlösung
5. Strom/Spannungsverhältnisse und zeitliche Dauer der einzelnen Elektrophoresegänge

Es erwiesen sich weiter von Bedeutung:

6. die Trocknung und Anfärbung der Pherogramme
7. die Auswertung.

1. Verdünnung des Eiklars

In unserem Falle hatten die Vorversuche gezeigt, dass sich Eiklar in den üblichen Puffergemischen gut löste. Anders lagen dagegen die Verhältnisse beim Eigelb, das in den Pufferlösungen lediglich eine trübe und milchige Emulsion bildete.

Erst bei Verwendung von 10%iger NaCl-Lösung, die mit einigen Tropfen 0,1n NaOH-Lösung auf den pH-Wert 8,4—8,8 eingestellt wurde (Glaselektrode «Polymetron»), konnte auch beim Eigelb eine befriedigende Auflösung erhalten werden, wobei zwar die Lösung auch dann noch ziemlich opak blieb.

Um sowohl Eiklar wie Eigelb unter möglichst analogen Versuchsbedingungen zu untersuchen, führten wir auch beim Eiklar Lösungsversuche mit 10%iger, auf pH 8,4—8,8 eingestellter NaCl-Lösung durch, was gleichfalls zu guten Ergebnissen führte.

Da das Mass der Verdünnung für das Erzielen guter Pherogramme von Bedeutung ist, wurde als erstes eine Verdünnungsreihe angesetzt, um die optimale Verdünnung des Eiklars mit NaCl-Lösung zu ermitteln.

Es wurden dabei Verdünnungen in der Grösse von 1 : 3 bis 1 : 10 gewählt.

Mit je 0,01 ml der klaren Lösungen wurde eine papierelektrophoretische Fraktionierung durchgeführt, wobei die Verdünnung 1 : 5 die besten Pherogramme lieferte. Unterhalb dieser Verdünnung war die Weglänge zwischen dem am langsamsten und dem am schnellsten wandernden Anteil zu gering, wodurch die mittleren Banden zum Teil verdeckt wurden. Bei höheren Verdünnungen trat Schwächung der Proteinbanden ein, wovon wiederum die Fraktionen mittlerer Wanderungsgeschwindigkeit am meisten betroffen wurden, da sie ohnehin nur in geringer Menge vorhanden sind.

Als optimale Verdünnung ergab sich aus diesen Versuchen demnach ein Mischungsverhältnis von

$$\begin{aligned} 1 \text{ Volumteil Eiklar} + 4 \text{ Volumteile } 10\% \text{ ige NaCl-Lösung} \\ = \text{Verdünnungsverhältnis } 1 : 5 \end{aligned}$$

Die durch Zentrifugieren vom unlöslichen Mucin befreite Lösung wurde nun in 3 Teile geteilt. Der erste Teil der Lösung wurde bei Zimmertemperatur gegen den anzuwendenden Veronal-Acetatpuffer dialysiert, der im Verlauf der Dialyse mehrere Male ausgewechselt wurde; nach 48 Stunden konnten keine Cl⁻-Ionen mehr nachgewiesen werden, so dass die Dialyse als beendet betrachtet wurde.

Der zweite Teil wurde durch ein Faltenfilter filtriert, wobei nur ein geringer, kaum wahrnehmbarer Rückstand auf dem Filter zurückblieb. Der Rest des Zentrifugats erfuhr keine Nachbehandlung.

Die drei Lösungen wurden anschliessend papierelektrophoretisch untersucht, wobei folgende Ergebnisse erzielt wurden:

- a) Sowohl der dialysierte als auch der filtrierte Flüssigkeitsanteil ergaben gleichwertige Pherogramme, deren Bilder sich in nichts Wesentlichem unterschieden.
- b) Das elektrophoretische Bild des unbehandelten Zentrifugats ähnelte zwar den beiden anderen Pherogrammen, jedoch waren die Proteinbanden weniger scharf und die Anfärbung weniger regelmässig, woraus geschlossen wurde, dass in der Lösung noch geringe unlösliche Bestandteile vorhanden waren.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass eine Filtration des Zentrifugats am Platze ist, Dialyse gegen Pufferlösung jedoch keine besseren Resultate liefert.

Alle zur Untersuchung gelangenden Eiklarlösungen wurden deshalb nach dem Zentrifugieren durch ein Faltenfilter filtriert, das Filtrat zur Konservierung mit einigen Kristallen Thymol versetzt und im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2. Wahl der Pufferlösung

Verschiedene Veronal-Acetatpufferlösungen der

Ionenstärke $i = 0,1$
 $0,15$
 und $0,25$,

unter Zusatz von NaCl und ohne solchen, wurden auspropiert.

Durch entsprechende Verdünnung konnten Puffergemische wesentlich geringerer Ionenstärke erhalten werden, was von Vorteil war.

Im Verlauf unserer Untersuchungen erzielten wir im pH-Bereich 8,0—9,0 die besten Resultate mit folgendem Veronal-Acetatpuffer:

Ionenstärke i

$= 0,065 :$ 6,46 g Veronal-Na
 3,89 g Na-Acetat $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ pro 1000 ml Gesamtlösung
 85 ml 0,065n Essigsäure
 pH = 8,65

Nach Fertigstellung des Puffergemisches wurde jede der 4 Pufferkammern des «Elphor-H»-Gerätes mit 124 ml Pufferlösung gefüllt.

Die Lösung wurde für 5 Elektrophoresegänge benutzt, wobei nach jedem Versuch umgepolt wurde: es zeigte sich, dass hierbei eine genügende Gleichmässigkeit der Versuchsbedingungen gewährleistet blieb. Bei häufigerem Gebrauch bestand diese Sicherheit nicht mehr.

3. Wahl der Papiersorte

Für die Fraktionierung von Eiklar erwies sich das Papier Nr. 2043b (glatte Oberfläche) der Firma Schleicher & Schüll als besonders günstig, weshalb es bei unseren Untersuchungen ausschliesslich zur Anwendung gelangte.

Das Format des Streifens betrug $31,4 \times 3,8$ cm.

4. Auftragen der Eiklarlösung

Damit der Streifen mit beiden Enden gleichmässig tief in die Pufferkammer der Elektrophoresewanne tauche, wurden in 7,2 und 9,2 cm Entfernung vom Streifenende mit dem Bleistift zwei Querlinien gezogen, von denen die erstere die Auflagestelle des feuchten Streifens auf dem Tragrahmen des Gerätes markierte, während auf der Linie in 9,2 cm Entfernung vom Streifenende die Eiklarlösung aufgetragen wurde.

Während der ersten Versuchsreihen wurde die Substanz nach der Methode von *Peroza und Raccuglia* (1951) (*Wunderly* 1954) aufgetragen. Die Querkante eines entfetteten Objektträgers wurde gleichmässig mit der zu untersuchenden Menge Eiklarlösung benetzt, die ihrerseits durch leichtes Aufpressen auf die Startlinie des trockenen Elektrophoresestreifens auf diesen übertragen wurde.

Nun wurde der Streifen rasch durch die Pufferlösung gezogen, durch leichtes Abpressen mit Fliesspapier vom überschüssigen Puffer befreit und anschliessend in der Weise über den Tragrahmen gespannt, dass die Streifenenden gleichmässig tief in die Pufferbehälter tauchten.

Da die auf diese Weise aufgebrachten Proteinmengen stark schwankten und zudem Verschiebungen an der Auftragsstelle sich auf die Güte des Pherogrammes negativ auswirkten, wurden im späteren Verlauf der Untersuchungen die Pherogramme und damit verbunden auch die Auftragstechnik in einer Weise abgeändert, die es gestatteten, die Proteinlösung als Tropfen aufzutragen und im entwickelten Pherogramm trotzdem die einzelnen Fraktionen als scharfe Banden zu erhalten.

Wir stützten uns bei der Entwicklung dieser Technik auf die Erfahrungen, die zuerst *Werner Matthias* (1954) über die Verwendung eingeschnittener Chromatogramme für papierchromatographische Untersuchungen beschrieben hat. Diese Technik wurde in unserem Laboratorium stark ausgebaut und verfeinert und hat zu hervorragenden Trenneffekten geführt (*Potterat* 1956, *Sulser* 1956).

Wir versuchten deshalb, diese Methode auf die Papierelektrophorese ebenfalls zu übertragen. Zu diesem Zwecke wurde die Auftragsstelle durch Einschnitte in den Streifen auf verschiedene Weise verengt und die abgemessenen ml Proteinlösung als Tropfen direkt aus der Mikropipette an der verengten Auftragsstelle auf den Streifen gebracht.

Fast alle Arten der Verengung führten zu einem positiven Ergebnis, d.h. die tropfenförmig aufgetragene Versuchslösung lieferte schliesslich ein Pherogramm, das die einzelnen Proteinfractionen als scharfe Banden enthielt. Da jedoch bei der Mehrzahl die Banden mehr oder weniger gekrümmt waren, konnten solche Streifen nicht gut ausgewertet werden.

Folgende Methode erwies sich schliesslich als besonders günstig, da bei ihr die Banden nicht nur scharf, sondern auch ungekrümmt erhalten wurden (Fig.1):

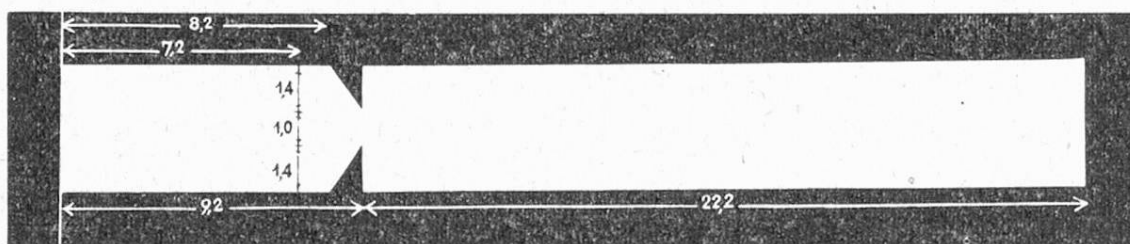


Abbildung 1
Streifenform zur Papierelektrophorese von Eiklar

Da die auf diese Weise erhaltenen Pherogramme ebenfalls scharfe Banden aufwiesen, wendeten wir seither nur noch diese Art der verengten Elektrophoresestreifen an. Dadurch, dass die Substanz als genau abgemessener Tropfen zur Untersuchung gelangte, konnte sie auf den feuchten, schon eingespannten Streifen aus der Pipette auslaufen gelassen werden. Eventuelle Veränderungen bzw. zu starke Absorption durch die Zellulosefaser, verursacht durch mehr oder weniger langes Eintrocknen der Proteinlösung beim Auftragen auf den trockenen Streifen, wurden auf diese Weise vermieden und die Konstanz der aufgetragenen Proteinmengen sichergestellt.

5. Strom/Spannungsverhältnisse und Dauer der Elektrophoresegänge

Als Kriterium zur Feststellung der günstigsten Strom- und Spannungsverhältnisse wählten wir die möglichst weitgehende und sauberste Aufteilung der Proteinfraktionen.

Zu Beginn wurden Elektrophoresegänge bei 140 Volt Spannung durchgeführt, wobei die zeitliche Dauer des Versuchs 15 bzw. 8 Stunden betrug. Im ersten Fall wurden Pherogramme erzielt, deren Banden aber unscharf und verzerrt waren und die folglich schlecht ausgewertet werden konnten.

Bei einer zeitlichen Dauer von 8 Stunden dagegen resultierten Pherogramme, deren Banden zwar schärfer waren, dieser Vorteil jedoch durch die unbefriedigende Auftrennung der Globulin- und Ovomucoidfraktion aufgehoben wurde. Aus diesen Gründen wurde bei gleichbleibender Versuchsdauer die Spannung auf 210 Volt erhöht, wobei sich auch unter diesen Bedingungen eine Laufzeit von 15 Stunden als ungünstig erwies, da die Banden gleichfalls verzerrt und deshalb nicht gut ausgewertet werden konnten. Dagegen wurden bei 8stündiger Versuchsdauer Pherogramme erzielt, die ausser scharf begrenzten Banden auch eine befriedigende Auftrennung der Globulin- und Ovomucoidfraktion aufwiesen.

Um die unterste Zeitgrenze für eine gute Aufteilung zu ermitteln, wurden Pherogramme dargestellt, deren Versuchsdauer sich auf 1 bis 10 Stunden erstreckte.

Das erste verwertbare Pherogramm, das 4 Zonen aufwies und infolgedessen ausgewertet werden konnte, wurde nach 6 Stunden Versuchsdauer erhalten. Nach 7 und 8 Stunden erwies sich die Fraktionierung als noch etwas günstiger, dagegen konnte bei 9- bis 10stündiger Elektrophoresedauer keine Verbesserung der Auftrennung erzielt werden.

Erhöhung der Gleichrichterspannung war nicht von Vorteil, weil dadurch die Banden zu nah nebeneinander zu liegen kamen. Ausserdem wirkte sich die erhöhte Stromwärme in einer stärkeren Flüssigkeitsverdunstung auf dem Streifen aus, so dass sich auf ihm nach beendetem Versuch unter Umständen sogar eine feine Salzkruste bildete.

Bei Einhaltung der übrigen Variablen erwies sich folgende Gleichrichterspannung und Versuchsdauer als besonders vorteilhaft:

- a) Gleichrichterspannung = 210 Volt
- b) Zeitliche Dauer des Versuchs = 8 Stunden.

6. Anfärbung des Pherogrammes

Zur Anfärbung sind mehrere Farbstoffe in Vorschlag gebracht worden, von denen besonders das *Azokarmin B* und das *Amidoschwarz 10 B* die grösste Anwendung finden.

Daneben sind in der Literatur noch weitere Farbstoffe beschrieben, so Bromphenolblau (*Durum* 1950, *Cremer* 1950), Ponceau 2 R (*Röttger* 1953), Mischungen von Neucoccin und Naphtalinblauschwarz B nebst Kupfer- oder Nickelacetat (*Michl* 1952) sowie Lichtgrün SF (*Caspani* 1954, *Wunderly* 1954).

Für unsere Zwecke haben wir Azokarmin B, Amidoschwarz 10 B und Ponceau 2 R getestet, wobei der letztgenannte Farbstoff schon nach einigen Versuchen fallen gelassen wurde, da seine Anfärbungen zu wenig intensiv waren.

Die Anfärbungen mit Azokarmin B und Amidoschwarz 10 B befriedigten zunächst auch nicht ganz. Ersterer Farbstoff gab niedrigere Extinktionswerte, während bei Amidoschwarz 10 B die vollständige Entfärbung des mit Protein unbeladenen Papieranteils nicht restlos gelang.

Durch Kombination der Elutionsmethode von *Grassmann* und *Hannig* (1952) — Behandlung mit 90 % reinem Methanol und 10 % Eisessig — mit derjenigen von *Pucar* (1954) — Auszug mit 5 %iger heisser Essigsäure — und einer geringfügigen Modifikation dieser letzteren wurden schliesslich befriedigende Resultate erhalten.

Der Streifen wurde abwechslungsweise in Methanol, das 10 % Eisessig enthielt, und 5 %iger, kalter Essigsäure gewaschen. Hierbei trat auch beim Amidoschwarz eine rasche und gründliche Entfernung des überschüssigen Farbstoffes vom unbesetzten Streifenteil ein. Je nach der Häufigkeit des Flüssigkeitsaustausches wurden schon nach einer Stunde Elutionsdauer rein weisse Streifen erhalten, während die Proteinbanden dunkelblau gefärbt blieben.

7. Auswertung

Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten zur Auswertung der gefärbten Pherogramme:

- a) Elution der einzelnen Farbbanden und Messung des Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Farblösungen auf kolorimetrischem oder spektrophotometrischem Wege.
- b) Direkte Photometrierung des durchsichtig gemachten Streifens und Registrierung des Extinktionskoeffizienten durch spezielle Verstärker.

Da die vorliegenden Untersuchungen den Zweck hatten, mit Hilfe einfacher und nicht zu kostspieliger Mittel gute Endergebnisse zu erzielen, die von jedem normal ausgerüsteten Laboratorium nachgeahmt werden konnten, wählten wir die letzterwähnte Methode an.

Hierbei bedienten wir uns eines lichtelektrischen Photometers, dessen Konstruktion eine direkte Photometrierung der Pherogramme gestattete (*Grassmann und Mitarbeiter 1951, 1952*; Hersteller: Firma Dr. Bender & Dr. Hobein, München, Karlsruhe, Zürich).

Der angefärbte Elektrophoresestreifen wurde in eine Transparenzlösung gelegt, die denselben Brechungsindex wie die Zellulose besass; nach einigen Stunden war das Papier damit durchtränkt und vollkommen durchsichtig, während sich die farbigen Proteinbanden scharf davon abhoben.

Grassmann und Mitarbeiter geben als Transparenzlösung eine Mischung aus gleichen Teilen Bromnaphthalin und Paraffinöl an (Brechungsindex $D_{20} = 1,51$).

Obwohl mit obiger Lösung gute Erfolge erzielt wurden, entschlossen wir uns auf Grund von Vergleichsversuchen zur Anwendung von *Anisol* (*Merck*, pro Analyse, Brechungsindex $D_{20} = 1,518$) als Transparenzflüssigkeit (*Pieper und Karas 1953*). Lag das Produkt im angeführten Reinheitsgrad vor, so konnte es ohne Vorbehandlung benutzt werden, andernfalls wurde es vor der Verwendung nochmals einer fraktionierten Destillation unterworfen.

Es waren verschiedene Vorteile, welche hierfür den Ausschlag gaben:

- a) Leichtere Handhabung. Der mit Anisol getränkte Streifen liess sich viel schneller luftblasenfrei zwischen die Glasplatten einbetten, als es beim Transparenzöl der Fall war. Zudem war die Reinigung der Glasplatten bei Verwendung des viskosen Oeles viel zeitraubender als beim Anisol.
- b) Der preisliche Unterschied zwischen Transparenzöl und Anisol.

Nachdem die zu untersuchenden Streifen (nebst den beiden Glasplatten vom Format 16×4 cm) über Nacht in Anisol gelegen hatten, wurden sie luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gebettet und anschliessend das überschüssige Anisol vorsichtig entfernt, so dass der Lichtstrahl keinerlei Schwächung durch äussere Verunreinigung erfuhr. Hierauf konnte in üblicher Weise photometriert werden.

Werden die Extinktionswerte in der Ordinatenrichtung, die ihnen entsprechenden Millimeter (vom Auftragspunkt = 0 aus gemessen) auf der Abszisse aufgetragen, so entstehen Kurvenbilder, die mit denjenigen der freien Elektrophorese grosse Aehnlichkeit besitzen. Im Idealfall und bei genügend grossen Wanderungsunterschieden würde jeder gefärbten Zone ein von den andern klar getrennter Ausschlag des Photometers entsprechen, der in der Abbildung einer *Gauss'schen* Verteilungskurve ähneln müsste.

Solche Auftrennungen werden jedoch praktisch niemals erhalten, sondern es treten immer mehr oder weniger grosse Ueberschneidungen der einzelnen Ausschläge auf, was sich darin äussert, dass die Extinktionswerte zwischen 2 Banden fast nie auf den Nullwert absinken. In gewissen Fällen kann es schon als Erfolg betrachtet werden, wenn eine ursprünglich homogene Bande so aufgetrennt wird, dass im Kurvenbild wenigstens zwei deutliche Gipfel auftreten.

Um trotz der beschriebenen Einschränkungen des Idealfalles befriedigende und reproduzierbare Auswertresultate zu erhalten, wurden verschiedene Methoden der Kurvenausmessung in Vorschlag gebracht.

Wir treten auf die Einzelheiten nicht weiter ein, sondern nennen vor allem die Methode von *Tiselius* und *Kabat* (1939), die uns sehr gute Dienste erwiesen hat. Diese Autoren haben schon frühzeitig ein Verfahren zur Ausmessung von Schlierendiagrammen beschrieben, das die *Gauss'sche* Verteilungsfunktion nicht berücksichtigt. Sie zogen vom tiefsten Punkt zwischen je zwei Gipfeln Senkrechte zur Abszisse, wodurch das Diagramm in einzelne Teilflächen zerlegt wurde, die planimetriert und ausgewertet werden konnten. Zwar wird in diesem Fall auf die Darstellung von *Gauss-Kurven* verzichtet, doch ist der hierdurch begangene Fehler vermutlich viel kleiner als die willkürliche Ergänzung zu Verteilungskurven, besonders wenn der Verlauf der einzelnen Kurvenabschnitte ohnehin nur in beschränktem Masse *Gauss-Kurven* entspricht.

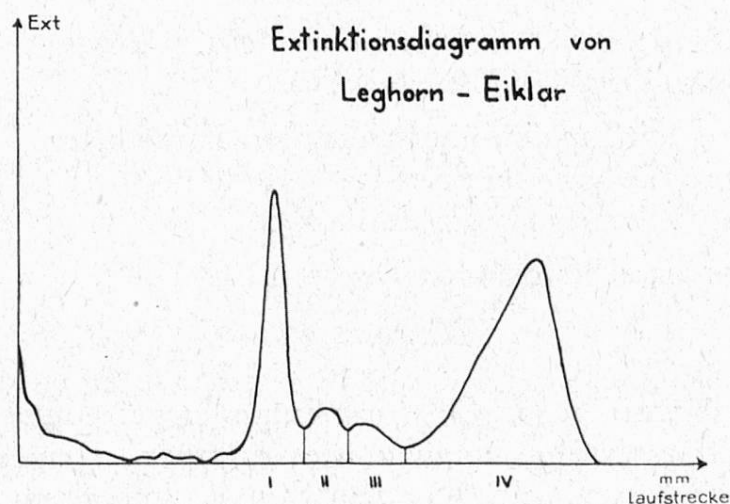


Abbildung 2

B. Zusammenfassend ergibt sich folgende Arbeitsmethodik

1. Apparate:

- a) *Elphor-H Elektrophoresekammer* nach Grassmann und Hannig (1950, 1951, 1952, Wunderly 1953, 1954).
Hersteller: Firma Dr.Bender & Dr.Hobein - München, Karlsruhe, Zürich.
- b) *Elektronischer Gleichrichter* (Konstruktion D. Högl, Bern).
Maximalspannung = 600 Volt
Maximalstromstärke = 200 Milliampère
- c) *Papiersorte*
Schleicher & Schüll Nr. 2043b (glatte Oberfläche)
Format des Streifens: $3,8 \times 31,4$ cm
Der Streifen wurde, wie auf Seite 106 erwähnt, zugeschnitten.
- d) *Gerät zur photometrischen Auswertung der Pherogramme* nach Grassmann und Hannig (1952, Wunderly 1953, 1954).
Hersteller: Firma Dr.Bender & Dr.Hobein - München, Karlsruhe, Zürich.
- e) «Ott»-Planimeter (Vertrieb: Firma Dr. Bender & Dr. Hobein).

2. Reagenzien:

- a) 10%ige NaCl-Lösung (NaCl pro analysi), mit einigen Tropfen 0,1n NaOH auf pH 8,6 eingestellt (Glaselektrode «Polymetron»).
- b) *Veronal-Acetatpuffer* folgender Zusammensetzung:
Veronal-Na = 6,46 g
Na-Acetat $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ = 3,89 g
0,065n Essigsäure = 85 ml
Auf 1000 ml mit Wasser auffüllen.
pH = 8,6 (Glaselektrode «Polymetron»)
Ionenstärke I = 0,065
- c) *Gesättigte Lösung von Amidoschwarz* in einer Lösung von 9 Volumteilen Methanol (purum) und 1 Volumteil Eisessig.
- d) *Elutionsflüssigkeit* für den überschüssigen Farbstoff:
 1. 10 vol.%ige Lösung von Eisessig in Methanol
 2. 5 vol.%ige, wässrige Essigsäurelösung.
- e) *Anisol* puriss., Brechungsindex $D_{20} = 1,518$.

3. Ausführung:

Eiklar und Eigelb werden sorgfältig voneinander getrennt.

5—10 ml des Eiklars werden in einem Messzylinder abgemessen, desgleichen in einem zweiten Messzylinder das dem Eiklarvolumen entsprechende vierfache Volumen 10%ige NaCl-Lösung.

Der grösste Teil der abgemessenen NaCl-Lösung wird in ein Becherglas gegossen und mit dem Magnetrührer vorsichtig gerührt, während man das Eiklar langsam zugiesst. Mit dem Rest der NaCl-Lösung wird der das Eiklar enthaltende Messzylinder einige Male vorsichtig gespült und die Flüssigkeiten zur übrigen Eiklarlösung gefügt. Die Lösung wird 15 Minuten mit dem Magnetrührer gerührt, wobei gegen Schluss die Tourenzahl etwas erhöht werden kann.

Die im Verhältnis 1 : 5 verdünnte Eiklarlösung wird anschliessend in der «Ecco»-Zentrifuge bei 3500 rpm 15 Minuten zentrifugiert, die überstehende Lösung vom Mucinniederschlag abgegossen und durch ein Faltenfilter filtriert. Mit einigen Kristallen Thymol versetzt, kann diese Lösung im Eisschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ praktisch unbegrenzt aufbewahrt werden.

Die papierelektrophoretische Fraktionierung gestaltet sich folgendermassen:

Die 4 Pufferbehälter einer Elphor-H-Wanne werden mit je 124 ml Pufferlösung gefüllt. Der zugeschnittene Papierstreifen wird mit Pufferlösung getränkt und die überschüssige Flüssigkeit durch leichtes Abpressen mit Fliesspapier entfernt.

Die Querlinie in 7,2 cm Entfernung vom Streifenende dient als Markierung für die Auflage des Streifens auf dem Tragrahmen des Gerätes. In dieser Weise eingespannt, tauchen beide Streifenenden gleich tief in die Pufferlösung. Auf den eingespannten, feuchten Streifen wird an der engsten Stelle (9,2 cm vom Streifenende entfernt) mit einer Mikropipette (0,1 ml Inhalt) 0,01 ml Eiklarlösung aufgetragen. Anschliessend wird die Wanne mit dem Gleichrichter verbunden, und zwar so, dass der Auftragspunkt auf die Kathodenseite zu liegen kommt, die Wanderung folglich in anodischer Richtung verläuft.

Die mit einem Glasdeckel verschlossene Wanne wird 8 Stunden einem Spannungsgefälle von 210 Volt ausgesetzt, wobei die Stromstärke zu Beginn 3,2 Milliampère, am Schluss des Versuches 6,0 Milliampère betragen soll. Nach Abschaltung des elektrischen Stromes werden die Streifen vorsichtig aus der Wanne genommen, in horizontaler Lage über einen Glasrahmen gelegt und dieser in den Trockenschrank gestellt, wo die Streifen während 15 Minuten bei 80°C getrocknet werden. Man schneidet die Enden der trockenen Streifen so weit ab, dass ein Pherogramm von ca. 17—18 cm resultiert.

Nun verbringt man die Pherogramme für 10 Minuten in das Färbebad, das aus einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz in Methanol + 10 % Essigsäure besteht.

Anschliessend wird der überschüssige Farbstoff in der Weise eluiert, dass die angefärbten Streifen abwechselungsweise je 10—15 Minuten in Methanol, das 10 % Eisessig enthält, sowie in 5 %ige wässrige Essigsäure gelegt werden. Auf diese Weise können schon nach 1—2 Stunden rein weisse Pherogramme erhalten werden, auf denen sich die dunkelblauen Proteinbanden scharf abheben.

Nach dem Trocknen der Streifen an der Luft werden sie einige Stunden, am besten über Nacht, in Anisol puriss. vom Brechungsindex $D_{20} = 1,518$ gelegt, wodurch sie durchsichtig werden. In diesem Zustand bettet man sie zwischen 2 Glasplatten vom Format 4×16 cm, die ihrerseits auf den verschiebbaren Metallrahmen des lichtelektrischen Elphor-H-Photometers gelegt werden.

Mit dem photometrischen Auswertegerät wird die Extinktion pro Millimeter Streifenlänge gemessen, wobei der Galvanometerausschlag des Gerätes als direktes Mass für die Stärke der Extinktion verwendet werden kann.

Die Messergebnisse werden in der Ordinatenrichtung, die ihnen entsprechenden Millimeter auf der Abszisse aufgetragen, wobei der Startpunkt der Eiklarlösung als Nullpunkt zu wählen ist. Auf diese Weise werden Extinktionsdiagramme erhalten, deren Teilflächengrößen wir als direktes Mass für die Intensität der Proteinbanden einsetzen.

Von den tiefsten Punkten der Kurvenzüge I, II, III und IV werden Senkrechte zur Abszisse gezogen und die so erhaltenen Kurvenflächen mit dem «Ott»-Planimeter (Vertrieb: Dr. Bender & Dr. Hobein - München, Karlsruhe, Zürich) getrennt ausgemessen.

Durch Addition der Einzelflächen wurde der Gesamtinhalt des Diagramms im Bereich der Kurventeile I—IV erhalten, aus dem wiederum der prozentuale Anteil der Einzelflächen ermittelt werden konnte, die jeweils einer bestimmten Proteinfraktion entsprachen.

Ueber die Ergebnisse soll in einer 2. Mitteilung berichtet werden.

Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die Beziehungen zwischen der klassischen und der Papierelektrophorese, sowie die Faktoren, welche die Wanderung der Teilchen beeinflussen, dargelegt. Im Anschluss hieran wird die Auswirkung dieser Faktoren auf die Eiroteine theoretisch untersucht und daraus die günstigsten Bedingungen für eine gute Aufteilung abgeleitet.

Der zweite Teil befasst sich mit der Chemie der Eiroteine und deren Verhalten bei der praktischen Elektrophorese.

Im dritten, experimentellen Teil werden die Versuchsbedingungen, wie sie sich bei einer eingehenden praktischen Bearbeitung als günstig erweisen, festgelegt und die Detailvorschriften gegeben, die es gestatten, ein Pherogramm mit einer Aufteilung in vier Proteinfaktionen zu erhalten.

Résumé

La première partie de ce travail traite des rapports qui existent entre l'électrophorèse classique et l'électrophorèse sur papier, ainsi que des facteurs qui influent sur le déplacement des substances. L'influence de ces facteurs sur les protéines de l'oeuf est examinée du point de vue théorique et l'on en déduit quelles sont les conditions de séparation les plus favorables.

La deuxième partie traite de la chimie des protéines de l'oeuf et de leur comportement électrophorétique.

Dans la troisième partie, qui est la partie expérimentale, on précise quelles sont les conditions pratiques favorables pour séparer les protéines de l'œuf et obtenir 4 fractions sur le phérogramme.

Summary

Theoretical considerations on the electrophoresis and description of the separation of the egg proteins by paper electrophoresis in 4 fractions.

Literaturverzeichnis

- Alderton G., Ward W. H., Fevold H. L., J. Biol. Chem. **157**, 53 (1945)
Advances in Protein Chemistry VI, 187-252, Academic Press New York 1951
Antweiler H. J., Koll. Z. **115**, 130 (1950)
Antweiler H. J., «Die quantitative Elektrophorese in der Medizin», Berlin 1952
Bain J. A. und Deutsch H. F., J. Biol. Chem. **171**, 531 (1947)
Beythien A., «Handbuch der Nahrungsmitteluntersuchung», Tauchnitz 1914, 1920
Blackwood J. H. und Wishart G. M., Biochem. J. **28**, 550 (1934)
Caspani R. und Magistretti M., Plasma **2**, 1 (1954)
Chargaff E., J. Biol. Chem. **142**, 491 (1942)
Cohn E. J. und Edsall J. T., «Proteins, Amino Acids and Peptides» 1943, Reinhold Publ. New York
Cremer D. und Tiselius A., Biochem. Z. **320**, 273 (1950)
Csonka F. A. und Jones M. A., J. of Nutr. **46**, 531 (1952)
Durrum E. L., J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2943 (1950)
Fevold H. L. und Lausten A., Arch. Biochem. **11**, 1 (1946)
Forsythe R. H. und Foster J. F., J. Biol. Chem. **184**, 377, 385 (1950)
Fredericq E. und Deutsch H. F., J. Biol. Chem. **181**, 499 (1949)
Grassmann W. und Hannig K., Naturwiss. **37**, 496 (1950)
Grassmann W., Hannig K. und Knedel M., Dtsch. Med. Wschr. **76**, 333 (1951)
Grassmann W. und Hannig K., Z. Physiol. Chem. **290**, 1 (1952)
Greenberg D. M., «Amino Acids and Proteins», Charles Thomas, Springfield 1951
Handbuch der Lebensmittelchemie, 3. Band (Bömer, Juckenack, Tillmans), Berlin 1936
Haugaard G. und Kroner T., J. Amer. Chem. Soc. **70**, 2135 (1948)
Kaminsky M., Biochim. Biophys. Acta **13**, 216 (1954)
Klobusitzky D. v. und König P., Arch. exp. Patholog. Pharmacol. **192**, 271 (1939)
König P., «Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel» Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1914, 1919
Kunkel H. und Tiselius A., J. Gen. Physiol. **35**, 89 (1951)
Labhard H., Lotmar W. und Schmid P., Helv. Chim. Acta **34**, 2449 (1951)
Lanni F. und Mitarb., J. Biol. Chem. **179**, 1275 (1949)
Lederer M., «Introduction to Paper Electrophoresis», Elsevier, Amsterdam 1955
Levene P. A. und Alsberg C. L., Z. Physiol. Chem. **31**, 543 (1900)
Levene P. A. und Alsberg C. L., J. Biol. Chem. **2**, 127 (1906)
Linderström-Lang K. und Ottesen M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg **26**, 403 (1949)
Lineweaver H. und Mitarb., Arch. Biochem. **16**, 443 (1947)
Longworth L. G., Cannan R. K. und Mac Innes D. A., J. Amer. Chem. Soc. **62**, 2580, (1940)

- Machebæuf M.* und Mitarb., Bull. Soc. Chim. Biol. **34**, 724 (1952)
Machebæuf M. und Mitarb., Bull. Soc. Chim. Biol. **35**, 334, 346 (1953)
Matthias W., Naturwissenschaften **41**, 17 (1954)
Mecham D. K. und *Olcott H. S.*, Federation Proc. **7**, 173 (1948)
Mecham D. K. und *Olcott H. S.*, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 3670 (1950)
Michl H., Monatshefte für Chemie **83**, 210 (1952)
Osborne T. B. und *Campbell G. F.*, J. Amer. Chem. Soc. **22**, 413, 422 (1900)
Peroza L. und *Raccuglia G.*, Boll. Soc. Ital. Biol. Spez. **24**, 1540 (1951)
Pieper I. und *Karas U.*, Biochem. Z. **324**, 499 (1953)
Potterat M., diese Mitteilungen **47**, 66 (1956)
Pucar Z., Acta Pharm. Yugoslav. **4**, 10 (1954)
Röttger H., Klin. Wschr. **31**, 85 (1953)
Schleicher & Schüll, «Literaturzusammenstellung über Papierchromatographie und Papierelektrophorese» I–V (1946–1955)
Schweiz. Lebensmittelbuch, 4. Aufl. 1937, korr. Neudruck 1950
Shephard C. S. und *Hottle G. A.*, J. Biol. Chem. **179**, 399 (1949)
Sörensen M., Compt. rend. trav. lab. Carlsberg **20**, 3 (1934)
Sulser H., diese Mitteilungen **47**, 149 (1956)
Swigel M. M. und *Posternak T.*, Compt. rend. soc. biol. **184**, 909 (1927)
Tiselius A., Trans. Farad. Soc. **33**, 524 (1937)
Tiselius A., Naturwiss., **37**, 25 (1950)
Tiselius A. und *Kabat*, J. Exp. Med. **69**, 119 (1939)
Turba F. und *Enenkel H.*, Naturwiss. **37**, 93 (1950)
Turba F., «Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie», Springer 1954
Wieland Th., Angew. Chem. **60**, 313 (1948)
Wieland Th. und *Fischer F.*, Naturwiss. **35**, 29 (1948)
Wunderly Ch., Chimia **7**, 145 (1953)
Wunderly Ch., «Die Papierelektrophorese», Sauerländer Aarau und Frankfurt a.M. 1954
Wunderly Ch., Chimia **10**, 1 (1956)
Young E. G., J. Biol. Chem. **120**, 1 (1937)
Young E. G. und *Phinney J. I.*, J. Biol. Chem. **193**, 73 (1951).