

Catedra de fiziologie a I.M.F. Tg. Mureș (cond.: conf. Szabó István)

## CONSTRUIREA UNUI APARAT DE ELECTROFOREZĂ PE HÎRTIE DIN MATERIALE SIMPLE

Módy Jenő

Electroforeza pe hîrtie (5, 6, 10, 16, 19, 32, 35) se răspîndește tot mai mult în ultimii ani în dauna aparatelor tip Tiselius (41) scumpe și complicate. Acest fapt se explică însă nu numai prin prețul scăzut și prin alte multe avantaje față de aparatele optice. În primul rînd metoda necesită o cantitate minimă din materialul examinat (0,005—0,02 ml). (Recent s-a elaborat și metoda electroforezei pe ață, (22). Prin aceasta devine posibilă examinarea unor soluții proteice cu concentrație scăzută (urină conținînd proteine, lichide de perfusiune, extracte organice și tisulare 8, 21, 30, 31, 38, 39; lichid cefalorahidian 4, 39, 43), ceea ce nu se poate executa nici prin metoda Tiselius nici prin alte micrometode cunoscute (1). Însfîrșit cu ajutorul electroforezei pe hîrtie se pot analiza lipoproteidele (2, 12, 14, 15, 20, 21, 27, 31, 44, 46), glicoproteidele (2, 36, 42), precum și unii fermenți ai serului sanguin (40). Aparatele de electroforeză pe hîrtie construite în mod corespunzător cu o capacitate mărită fac posibilă examinarea concomitentă a mai multor probe. Metoda se poate deci întrebuița foarte bine pentru determinări în serii. Recent a fost aplicată cu succes și pentru fracționarea continuă a proteinelor serice (40, 17, 11, 4).

Interesul practic al metodei apare evident și în laboratoarele clinice. Cunoașterea spectrului protidic, sau a gradului disproteinemiei este un ajutor prețios pentru

clinician în stabilirea diagnosticului și pronosticului. Putem considera astăzi ca electroforeza pe hîrtie devine pentru laboratoarele clinice și de spital din ce în ce mai indispensabilă.

Aceste motive m-au determinat să public comunicarea prezentă. Principiile metodei sînt în general bine cunoscute (9, 24, 28), de aceea în cele expuse mai jos mă refer numai la datele tehnice necesare.

*Descrierea aparatului:* aparatul este compus din două părți (fig. nr. 1). Farța inferioară este camera uredă de electroforeză (a), în care sînt așezate soluția de tampon (h), fișii de hîrtie (1) și electrozii de cărbune (e). Pe această cameră se adaptează exact, capacul cu un acoperiș transparent, curbat (b). Peretele separator (f) în interiorul camerei formează un sistem labirint, făcînd imposibilă pătrunderea mai largă în tampon a impurităților provenite din dizolvarea moderată a electrozilor de cărbune (mai ales la anod).

Aparatele utilizate în străinătate sînt confecționate în general din materiale plastice (plexiglas, CPV, bachelită, celuloid etc.). În lipsa acestora însă, corespunde și sticla de geam. Fundul camerei este o placă de sticlă (19,7 x 24,4 cm, Fig. nr. 2). Pe marginile acestei plăci se lipesc laturile duble, tăiate din sticlă de geam de 3 mm. Rășina de lipit glijal s-a arătat foarte utilă pentru acest scop. Pentru asigurarea închiderii perfecte a capacului, laturile camerei sînt lipite din două

părți. Cea din afară este mai îngustă (2 x 19,1 respectiv 24,0 cm), iar cea dinăuntru mai lată (3 x 23,4 respectiv 18,5 cm). La capătul opus al laturilor lungi trebuie șle-

formă unghiulară, șlefându-l corect după forma orificiului. Contactul electrozilor cu conductele sursei de curent continuu poate fi realizat prin capace frezate din alamă

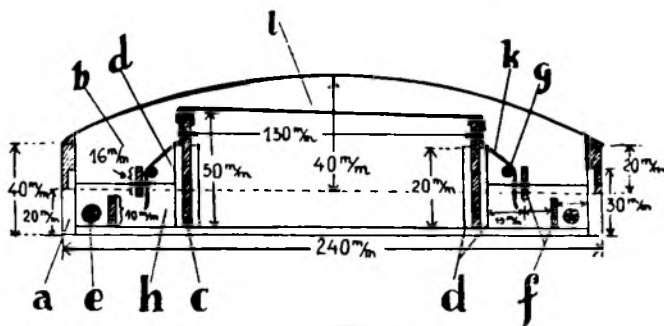


Fig. nr. 1.

Planul transversal al aparatului de electroforeză pe hirtie (însemnarea indicilor vezi în text).

fuit un orificiu rotund cu diametrul de 1 cm, în care se introduce electrodul printr-un dop, sau tub de cauciuc mai gros (j). În lipsa mijloacelor necesare pentru șlefuit, unele dintre capetele terminale ale laturilor respective se taie în formă de scară — H —, apoi părțile tăiate se lipesc din nou cu rezol, lăsând gol spațiul patrat cu dimensiunea dorită de 1 cm. În acest caz confecționăm și dopul de cauciuc în

(i), care fixează conductorul printr-un șurubul. În lipsa capacelor, firul poate fi înșurubat direct pe capătul electrodului dinafara camerei.

După confecționarea ramei, se lipesc lamele de sticlă, care formează sistemul de labirint (f), precum și cele, între care sînt întinse fișile de hirtie (c). Lama de labirint cea exterioară este lipită pe fundul camerei la o distanță de 1,5 cm de la

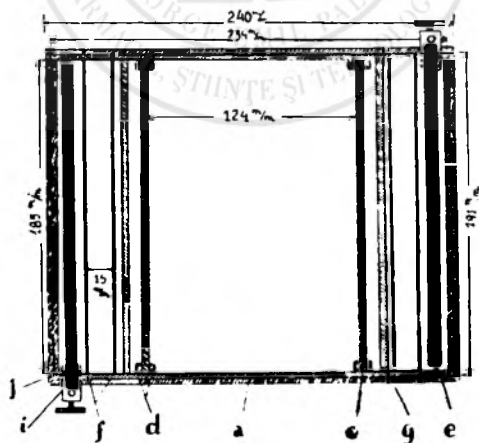


Fig. nr. 2.

Planul fundamental al aparatului de electroforeză pe hirtie.

latura ramei. (Dimensiunile: 1 x 18,5 cm). Lama cealaltă a labirintului este mai lată (1,6 x 18,5 cm) și este lipită tot la o distanță de 1,5 cm de la prima, dar în așa fel, încît marginea superioară să fie la nivelul marginii respective a laturilor camerei. Lamele de sticlă pentru susținerea și întinderea fișiiilor diferă de asemenea între ele. Una (spre anod) este mai lată (5 x 18,5 cm), iar cealaltă mai îngustă (4,5 x 18,5 cm). Scopul acestei dife-

renșunile capacului corespund celor ale camerei, cu deosebire că aici laturile exterioare sînt ceva mai largi (2 x 19,1 respectiv 24,0 cm și 1 x 23,4 respectiv 18,5 cm). Marginea superioară a laturii lungi a capacului este curbată, cu lățimea maximă (la mijloc) de 4 cm. Acoperișul capacului — pentru a asigura transparența — se confecționează din film Rtg. spălat. Convexitatea capacului are scopul ca picăturile de apă, care provin din condensarea

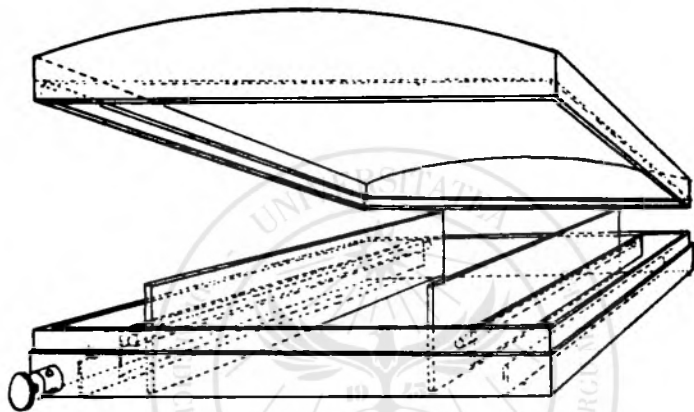


Fig. nr. 3.

Schița aparatului de electroforeză pe hirtie, instalat complet.

rențe este de a asigura migrarea fracțiunilor contra soluției tampon, care curge încet în direcția opusă cu deplasarea lor. Astfel limitele fracțiunilor rămân clare și bine definite.

Lipirea bețelor de sticlă (g), care susțin hirtia de filtru de transmisie (k) nu este necesară. Acestea pot fi fixate prin două dopuri de cauciuc perforate, sau bucăți de tub de cauciuc, aplicate la ambele capete ale bețelor. Astfel se poate ușor modifica și poziția lor după necesitate.

Pentru confecționarea capacului sticla nu este corespunzătoare. Materialul plastic poate fi înlocuit cu placă simplă de panel, care se acoperă complet cu film Rtg. spălat, pentru prevenirea îmbibării lemnului cu apă precum și a urmărilor acestui fapt (roadere, îndoire, deformare etc.). Pentru acest scop soluția de celuloză în acetonă conținând acid oxalic s-a dovedit a fi un material de lipit potrivit. Di-

vaporilor, să nu se stringă și să nu cadă peste fișiile de hirtie, ci să curgă în direcție laterală. Flaca de film se lipește între laturile duble ale capacului.

Schița aparatului se vede în figura nr. 3.

*Montarea aparatului:* 1. *Așezarea:* Aparatul trebuie așezat în așa fel încît planul transversal al fișiilor să fie drept, orizontal. (Dacă este posibil se controlează cu nivelă și în cazul devierii se aduce în planul dorit).

2. *Umplerea sistemului de labirint cu soluție tampon* (prepararea soluției vezi mai jos).

3. *Asigurarea comunicării fișiilor și a soluției de tampon:* pentru acest scop se taie din hirtie de filtru obișnuită două bucăți de 6 x 18 cm. Acestea după îmbibare cu tampon, se atașează sus la partea interioară a lamelor de sticlă, între care vor fi întinse fișiile. Hirtia aderentă se îndoaie apoi spre partea exterioară a lamei

și se trece peste bățul de sticlă (g), apoi se introduce în tampon (fig. nr. 4). Astfel putem economisi hîrtia de filtru de bună calitate: fișiile nu trebuie tăiate atît de lungi, ca ele să ajungă în tampon.

4. *Fișiile de hîrtie, aplicarea soluției de analizat, aplicarea fișiilor.* Tăiem din hîrtie filtru de bună calitate fiși de 2,5 x 17 cm și le umezim cu precauție cu soluție tampon (o umezire prea puternică sau insuficientă influențează în mod nefavorabil electroforeza!). Soluția de analizat se

a hîrtiei umede de transmisie. După aceasta, întinzînd-o puțin, aderăm și celălalt capăt pe partea anodică (fig. nr. 4). Fișiile adera în așa fel, că poziția lor inițială rămîne neschimbată în tot timpul experienței. În sfîrșit așezînd capacul, se face contactul cu sursa de curent continuu și electroforeza începe.

5. Ca sursă de curent continuu cel mai corespunzător este stabilizatorul electronic cu tensiune variabilă de la 100—250 Volți. În lipsa acestuia se poate utiliza un

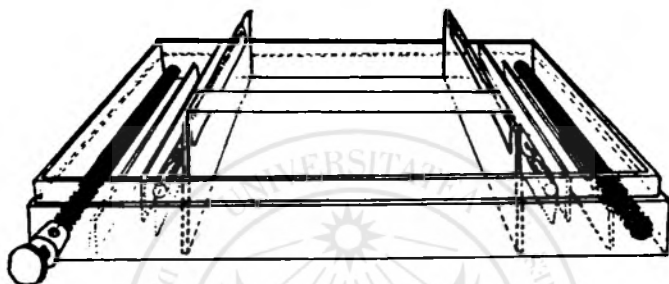


Fig. nr. 4.

Schița aplicării hîrtiei pentru transmisie și a fișiilor (explicare în text).

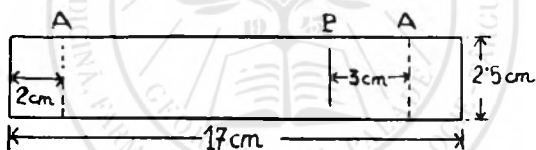


Fig. nr. 5.

Dimensiunile fișiilor de hîrtie pentru electroforeză (A=punctul de reazim, B=punctul de aplicare).

aplică pe partea catodică a fișiei la o distanță de cca 3 cm de la punctul de sprijin (Fig. nr. 5: B) în așa fel încît între capetele stratului aplicat și marginile fișiei să rămîna de ambele laturi o distanță de cca 2 mm. Cantitatea aplicată depinde de conținutul proteic al soluției de analizat. În cazul serurilor normale această cantitate este de 0,05 ml. Este folositor a însemna ușor locul aplicării (Fig. nr. 5: A) cu un creion moale. Aplicarea se face pe fișie umezită prin metode uzuale (micropipetă, bentiță de hîrtie filtru umedă, jghiab picurător).

Prima dată aderăm capătul fișiei apropiate de locul aplicării de partea catodică

redresor de orice tip, care asigură tensiunea corespunzătoare.

6. *Soluția de tampon:* corespunde atît tamponul veronal (veronal-Na /Veronal-Na 10,3 g, Veronal 1,84 g pro ltr.  $\rho = 0,06$ , pH=8,6), cît și tamponul veronal-Na/acetat de Na (Veronal-Na: 7,36 g, acetat de sodiu 3,86g ad 1.100 ml aq. dest.  $\rho = 0,06$ , hfi=9) rîspîndiți în general.

7. *Durata electroforezei:* 6 ore. Voltajul aplicat trebuie reglat în așa fel, încît intensitatea curentului să fie 1 mA pentru o fișie.

8. *Fixare, colorare, diferențiere:* Întrerupînd curentul cu electroforeza terminată, punem fișiile pe o placă de sticlă curată, le

uscăm într-un pupinel electric la 110° C timp de 10 minute (în lipsa acestuia se lasă la temperatura camerei pînă la uscare). După aceasta urmează colorația într-o soluție metanolică de „naftolblau-schwartz-12 B” saturată, conținind 10% acid acetic glacial, timp de 5 minute. (Colorantul se sintetizează la Uzinele „Colorom” din Codlea, dar în lipsa lui poate fi înlocuit cu orice alt colorant utilizat în general pentru acest scop: 5, 7, 16, 45). Fișiile se diferențiază apoi în alcool metilic conținind 10% acid acetic. În 90 minute schimbînd soluția de trei ori, colorantul se eluează aproape complet: în ferograma obținută se vad benzile fracțiunilor separate colorate în albastru închis.

9. *Evaluare*: se poate aplica orice metodă uzuală. Cea mai accesibilă este tăierea fișilor în părți egale, eluarea colorantului cu hidroxid de sodiu, apoi determinarea lui

colorimetrică (7). Cu o instalație potrivită fișiile se pot evalua direct pe calea fotometriei transparente (16, 19, 25). Calculînd spațiul sub curbele obținute (planimetric sau pe hîrtie milimetrică) se obțin concentrațiile relative la sută ale fracțiunilor proterice din soluția analizată. Datele sînt concordante — respectînd anumiți factori empirici (12, 16) — cu cele obținute prin metoda Tiselius.

10. *Hirtia de filtru*: Este neapărat necesară folosirea hîrtiei de bună calitate. Avînd ocazia să încercăm hîrțile Whatman Nr. I și IV, și Schleicher-Schüll 2043 a, toate le am găsit corespunzătoare. Este important ca prin aplicarea fișilor cu dimensiunile de mai sus, precum și a hîrtiei obișnuite pentru transmisie se obține o economie de cca patru ori mai mare.

*Sosit la redacție: la 24 ianuarie 1958.*

### Bibliografie

1. ANTWEILER H. J.: *Angew. Chem.* 1944, 59, 33; 2. BAUER H.: *Kl. Wschr.* 1954, 25/26, 512; 3. BRATTSTEN I.: *Continuous zone electrophoresis.* Almquist-Wiksell's Boktr. A. B. Uppsala. 1955; 4. BUCHER T., MATZELT D., PETTE D.: *Kl. Wschr.* 1952, 13/14, 325; 5.—6. CONSDEN B. R., GORDON A.H., MARTIN A. J. P.: *Biochem J.* 1956, 40, 33, 1957, 41, 590; 7. CREMER H. D., TISELIUS A.: *Bioch. Zschr.* 1950, 320, 273; 8. DEMLING L.: *K. Wschr.* 1952, 3/4, 74, 9. DIITMER A.: *Papirelektrophoresis* (G. Fischer Verl. Jena 1956); 10.—11. DURRUM E. L.: *J. Am. Chem. Soc.* 1939, 72, 2943, 1941, 73, 4877; 12. ESSER H., HEINZLER F., KAZMEIR F., SCHOLTAN F.: *Münch. Med. Wschr.* 1951, 93, 935; 13. FORBES A., TAYLOR J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1955, 90/2, 411; 14.—15. FRANKEN H., KLEIN E.: *D. Med. Wschr.* 1955, 1, 30, 1955, 29/30, 1074; 16.—19. GRASSMANN W., HANNIG K.: *Naturwiss.* 1950, 37, 496. *D. Med. Wschr.* 1951, 76, 33. *Hoppe-Seyler's Zschr. Phys. Chem.* 1952, 290, 1. *Kl. Wschr.* 1954, 32, 839; 20. FREI G., ALY F. W., OLDERSHAUSEN H. F.: *Kl. Wschr.* 1954, 27/28, 770; 21. GROS PH., WEICKER H.: *Kl. Wschr.* 1954, 21/22, 509; 22. GÖNTER-NOLLER H.: *Kl. Wschr.* 1954, 41/42, 988; 23. HÖHNE G., KÖNIG H. A.: *Kl. Wschr.* 1954, 31/32, 748; 24. IDU S. M., CIMPIANU I.: *Electroforeza E. S.* 1957; 25. KOVACS E., KISS I.: *sub presă*; 26. KUNKEL H. G., TISELIUS A.: *J. gen. Physiol.* 1951, 35, 89; 27. KUHN A. R., WIEDING H.: *Zschr. ges. inn. Med.* 1956, 2, 75; 28. LEDERER M.: *An Introduction to Paper Electrophoresis and related Methods* (Amsterdam, Houston, N. Y. 1955); 29. MIES H. J.: *Kl. Wschr.* 1953, 7/8, 159; 30. NOWY H., SEITZ W.: *Zschr. ges. exp. Med.* 1955, 126, 1. 1; 31. NOWY H., BLASIUS R., KARL O.: *Idem.* 1955, 26, 1. 12; 32. OTT H., ROTH E.: *Kl. Wschr.* 1954, 45/46, 1099; 33. PEZOLD F. A., KOFES A.: *Kl. Wschr.* 1954, 20/21, 504; 34. PIFER J.: *Kl. Wschr.* 1954, 25/26, 597; 35. PIPER J., MOLINSKY H.: *Kl. Wschr.* 1954, 41/42, 983; 36. ROMAI J. D.: *La Pr. Méd.* 1954, 76, 1578; 37. SCHLEYER F.: *Kl. Wschr.* 1956, 31/32, 730; 38. SPIER H. W., ROCKL H., PASCHER G.: *Kl. Wschr.* 1954, 33/34, 770; 39. SUNDERMANN A., ALTENBRUNN H. J.: *Zschr. ges. inn. Med.* 1956, 3, 105; 40. SWANSSON A., BRATTSTEN I.: *Ark. Kemi* 1949, 1, 401; 41. TISELIUS A.: *Diss. Uppsala* a 1930, *Nova Acta Red. Soc. Sci. Uppsala* 10, 1930, 7, 4; 42. TURBA F., ENENKEL A. J.: *Naturwiss* 1950, 37, 93; 43. WALLENFELLS K., PECHMANN E.: *Angew. Chem.* 1951, 63, 44; 44. WEISE H. J., ASSMANN D.: *Zschr. ges. inn. Med.* 1956, 22, 1045; 45. WIELAND TH.: *Angew. Chem.* 1950, 62, 31; 46. WUNDERLY CH., FILLER S.: *Kl. Wschr.* 1954, 17/18, 435.