

CHEMISCH WEEKBLAD

ORGAAN VAN DE NEDERLANDSE CHEMISCHE VERENIGING

INHOUD

	Bladz.		Bladz.
Verhandelingen, Overzichten, Verslagen.	229	Allerlei nieuws op chemisch en aanverwant gebied.	250
Dr. J. de Wael, Techniek en theorie van de papierelectrophorese.		Personalia.	251
Prof. M. Macheboeuf, Microélectrophorèse sur papier, avec évaporation continue du solvant (électrorhéophorèse).		Verenigingsnieuws.	251
Dr. G. A. J. van Os, Critische beschouwing over de quantitative bepaling van de eiwit-fractionen bij papierelectrophorese.		Mededelingen van het Secretariaat. — Chemische Kringen.	
Dr. C. L. Harders, Beschouwingen naar aanleiding van klinische ervaringen met papierelectrophorese.		Mededelingen van verwante verenigingen.	251
Drs. H. J. Peters, Papierelectrophorese van liquor cerebrosinalis.		Mededelingen van verschillende aard.	251
Dr. J. C. M. Verschure, Slotbeschouwing.		Aangeboden betrekkingen	252
		Vraag en Aanbod.	252
		Gevraagde betrekkingen.	252
		Agenda van vergaderingen	252

Symposium over Papierelectrophorese

gehouden op Zaterdag 29 November 1952 te Utrecht door de Vereniging voor Klinische Chemie, Sectie van de Nederlandse Chemische Vereniging

Techniek en theorie van de papierelectrophorese

door J. de Wael

541.18:537.36

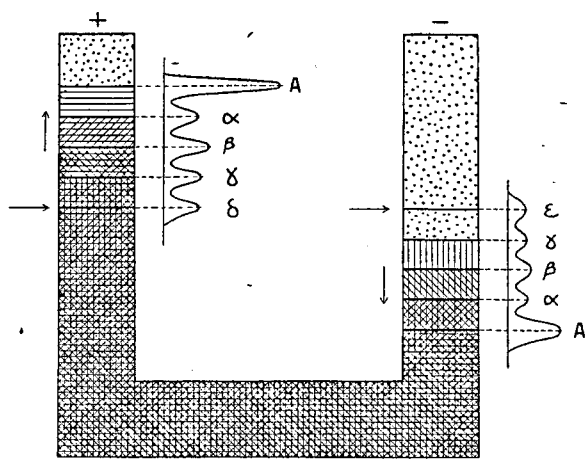
Laboratorium voor medisch-veterinaire chemie
der Rijks Universiteit Utrecht.

De techniek van de papierelectrophorese alsmede de photometring van de electrophorese-diagrammen wordt beschreven. In het theoretische deel wordt gewezen op de moeilijkheden bij het bepalen van de loopsnelheden van eiwittonen tengevolge van de electro-osmose, de capillaire structuur van papier en de verandering van de specifieke geleidbaarheid ter plaatse van het eiwit. In het supplement wordt een quantitative behandeling gegeven van de vloeistofstroom tengevolge van verdamping.

1. Electrophorese volgens Tiselius.

De onderscheiding van serumeiwitten door electrophorese is voor het eerst door *Tiselius* in 1937¹⁾ tot stand gebracht. Zoals bekend is wordt de electrophorese in een U-vormige buis uitgevoerd. Deze wordt tot de horizontale pijlen (fig. 1) gevuld met een tegen een bufferoplossing gedialyseerde oplossing van serum in deze zelfde bufferoplossing. De totale concentratie aan eiwit moet een tot twee procent zijn. Boven de eiwitoplossing wordt de bufferoplossing gebracht, waardoor er dus twee scherpe grensvlakken ontstaan tussen de oplossingen

met en zonder eiwit. Brengt men nu een electrisch potentiaal verschil aan, dan bewegen de eiwitten zich bij de gebruikelijke pH (> 7) naar de positieve pool. Aangezien de verschillende serumeiwitten een verschillende bewegelijkheid hebben ontstaan er dientengevolge grensvlakken die zich met verschillende snelheden bewegen. In het been, dat de positieve pool bevat bewegen zich deze grensvlakken naar de bufferoplossing toe (in fig. 1 links), in het andere been bewegen ze zich van de bufferoplossing af. Men spreekt in het eerste geval van stijgende, in het tweede van dalende grensvlakken. Aan ieder grensvlak ontstaat een concentratiesprong ten ge-



≡ = A (albumine) \\\ = α-globuline
 ≡ = β-globuline ||| = γ-globuline

Fig. 1. Electrophorese van bloedserum in een U-buis.

volge van de afwezigheid van een bepaald eiwit aan een zijde van dit grensvlak. Ten gevolge van diffusie krijgen de concentratiesprongen het karakter van concentratie-gradiënten. Deze concentratie-gradiënten $\frac{dc}{dx}$ waarmede parallel loopt een gradiënt

in de brekings-index $\frac{dn}{dx}$ worden met behulp van een

vrij ingewikkeld optisch systeem fotografisch geregistreerd als een kromme lijn, die het verloop van $\frac{dc}{dx}$ (of $\frac{dn}{dx}$) met de verplaatsing x weergeeft. De zo verkregen krommen zijn in fig. 1 zowel voor de stijgende als de dalende grensvlakken aangegeven. Het is gebleken, dat de snelst lopende component van de serumeiwitten het serum albumine is. De overige componenten zijn globulinen. *Tiselius* noemde ze in volgorde van afnemende beweeglijkheid. α-, β- en γ-globuline. Er treedt echter nog een concentratiesprong op en wel op de plaats van de oorspronkelijke scheidingsvlakken. *Tiselius* noemde deze stilstaande grenzen de δ- resp. ε-boundary.

Uit de diagrammen kan men de relatieve concentraties van de verschillende componenten berekenen door de oppervlakte van de bij de verschillende componenten behorende pieken te delen door het totale oppervlak; immers:

$$\int \frac{dc}{dx} dx = c.$$

Het zal duidelijk zijn, dat met behulp van op boven beschreven wijze uitgevoerde electrophorese geen scheiding van alle serumeiwitten mogelijk is. Slechts albumine en γ-globuline kunnen in het linker- resp. rechterbeen zuiver worden verkregen (zie fig. 1). Aan de electrophorese volgens *Tiselius*, hoe voortreffelijk overigens voor het doen van fundamenteel onderzoek, kleven voor toepassing bij klinisch-chemisch onderzoek verschillende bezwaren:

1. Het apparaat is zeer kostbaar.
2. Men heeft vrij veel serum nodig.
3. Het dialyseren tegen een bufferoplossing vergt veel tijd.
4. Men kan slechts één electrophorese tegelijk uitvoeren.

2. Papierelectrophorese.

a. Techniek.

Men kan echter electrophorese op een zeer veel eenvoudiger manier bedrijven, door buffer- en eiwitoplossing niet in een U-buis te brengen maar een strook filtreerpapier ermede te drenken. Men noemt dit papierelectrophorese. Deze is voor het eerst op eiwitoplossing toegepast door *Durrum*²⁾.

Hier volgt een beschrijving van de methode, zoals deze op het ogenblik in het Laboratorium voor Medische Veterinaire Chemie te Utrecht wordt toegepast.

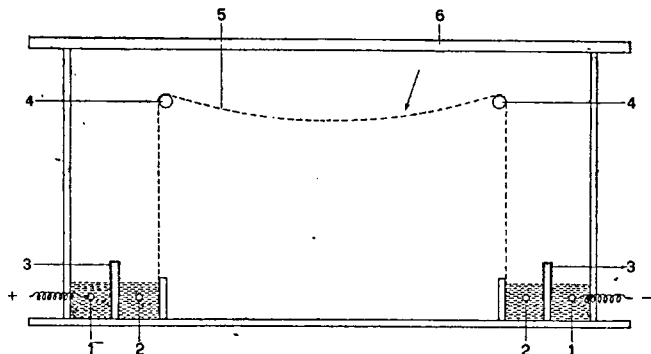


Fig. 2. Dwarsdoorsnede van het toestel voor papierelectrophorese.

In fig. 2 is het in gebruik zijnde apparaat in dwarsdoorsnede afgebeeld. Over de glasstaven (4) worden zes stroken van speciaal filtreerpapier (Macherey, Nagell and Co, F 214) van 6 × 52 cm gehangen.

De uiteinden hiervan hangen in met een bufferoplossing (veronal 0.01 M, veronal natrium 0.05 M, pH = 8.6) gevulde bakjes. Deze zijn op hun beurt door met een bufferoplossing gedrenkte strookjes filtreerpapier (3) verbonden met de twee buitenste bakjes, eveneens gevuld met bufferoplossing, waarin de elektroden (1) van roestvrijstaal zijn aangebracht.

Op deze wijze voorkomt men, dat de verandering van de pH in de elektroderuimte doordringt tot het filtreerpapier.

Het toestel, dat geheel van perspex is gemaakt, wordt afgesloten met een zware glazen plaat (6).

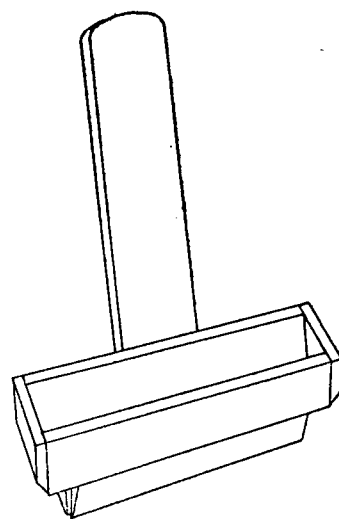


Fig. 3. Trogje voor het opbrengen van serum op het filtreerpapier.

Na 1.5 tot 2 uur zijn de stroken (5) door capillaire werking geheel met bufferoplossing gedrenkt. Nu wordt bij de pijl een smal streepje serum zo gelijkmatig mogelijk over de volle breedte van het filtreerpapier aangebracht. Daartoe wordt gebruik gemaakt van het in fig. 3 afgebeelde apparaatje. Dit is een wigvormige trog, van onderen voorzien van een spleet, 6 cm lang en 0.1 mm breed. Het toestelletje is van perspex gemaakt. In deze trog wordt met een pipet 0.06 ml serum gebracht. Nadat het serum zo gelijkmatig mogelijk over de trog is verdeeld door schudden of desnoods met behulp van een zeer dunne glazen staaf wordt de spleet gedurende ongeveer 1 minuut met een van de stroken (5) in contact gebracht. Het serum verdeelt zich dan gelijkmatig over het papier zodat er een eiwithoudend strookje van ongeveer 6×1 cm ontstaat. Evenzo doet men met de overige stroken. Men kan dus 6 sera tegelijk onderzoeken. Nu wordt een spanning van ca. 3 V/cm aangebracht met behulp van een plaatstroom-apparaat. Deze spanning wordt gemeten aan de hulp-electroden (2).

De electrophorese laat men nu gedurende 16 uur bij 25°C plaats vinden, of bij lagere temperatuur gedurende langere tijd. Om enigszins reproduceerbare resultaten te verkrijgen moet de temperatuur binnen 1 graad constant zijn, omdat de beweeglijkheid van ionen enkele procenten per graad temperatuurstijging toeneemt. Na afloop van de electrophorese worden de stroken gedurende 15 min bij 105°C gedroogd, waardoor de eiwitten door denaturatie geheel onoplosbaar worden. Om de eiwitten zichtbaar te maken worden deze gekleurd met azocarmijn-B volgens de methode van Turba³⁾. Daartoe worden de stroken gedurende 10 minuten in een verzadigde oplossing van azocarmijn-B in 50 vol % methanol, die bovendien 10 vol % ijsazijn bevat, gebracht. Daarna wordt de kleurstof, die niet door eiwit is gebonden, verwijderd door eerst 3 maal met 96 %-ige methanol en daarna met 10 %-ig azijnzuur te spoelen, tot het filtreerpapier daar, waar geen eiwit aanwezig is, vrijwel wit is geworden. De stroken worden daarna bij kamertemperatuur gedroogd.

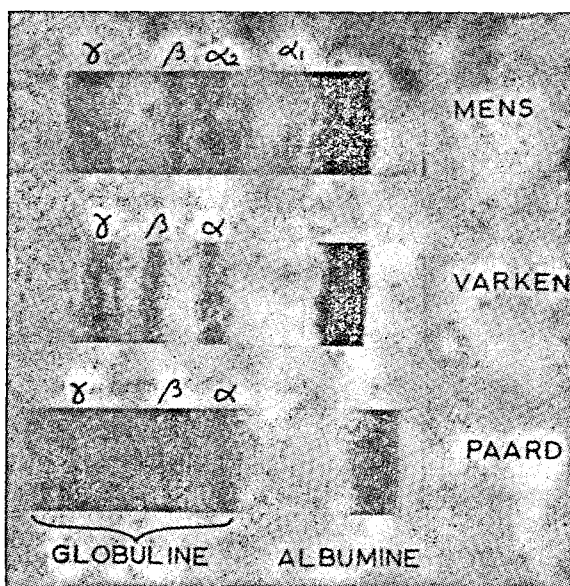


Fig. 4. Electrophoresediagrammen op papier van sera van resp. mens (boven), varken (midden) en paard (onder).

In fig. 4 zijn enkele op deze wijze verkregen diagrammen van serum van resp. een mens, een varken en een paard afgebeeld. De op deze diagrammen zichtbare banden zijn in werkelijkheid paarsrood gekleurd. Houdt men zich aan de voorgeschreven temperatuur en tijd van de electrophorese, dan heeft het gehele diagram een lengte van ongeveer 15 cm, zodat het geheel binnen de glazen staven (4) ontstaan is. Dit heeft het voordeel, dat deze laatste in het geheel niet met eiwit in contact komen, zodat onregelmatigheden, die hierdoor altijd ontstaan, uitgesloten zijn.

Wat zien we nu op de diagrammen?

Iets geheel anders dan bij de electrophorese in een U-buis. Daar toch kunnen slechts bewegende grensvlakken worden waargenomen. Van een scheiding van alle componenten van het serum is echter, zoals we zagen, geen sprake. Bij de papier-electrophorese, waar we uitgaan van een streepje serum met een breedte van ca. 1 cm verkrijgen we tenslotte een diagram van ca. 15 cm lengte. Hier kan dus wel degelijk een scheiding van alle componenten optreden. Deze componenten nemen we waar als gekleurde banden.

Er is nog een belangrijk verschil tussen de beide methodes. Vooral α - en β -globuline kunnen, speciaal in pathologische gevallen, vrij veel lipoïden binden. Deze geven bij de gewone electrophorese een belangrijke bijdrage tot de brekingsindex en gradiënt daarvan, zodat hun concentraties bij die van de globulines worden opgeteld. Bij de papierelectrophorese echter worden de lipoïden niet in rekening gebracht, aangezien ze niet door azocarmijn worden gekleurd.

In de drie diagrammen van fig. 4 zien we behalve de donkere band van het albumine bovendien nog drie banden van globulinen. Bij het diagram van het menselijke serum zien we bovendien nog een zeer zwakke band dicht bij het albumine, het α_1 -globuline.

Op de hoeveelheid van de verschillende serum-eiwitten quantitatief te bepalen kan men het gemakkelijkst het diagram doorzichtig maken en de hoeveelheid gebonden kleurstof met behulp van een photometer bepalen.

We gaan daartoe als volgt te werk. De na kleurinq verkregen, volkomen droge, diagrammen worden gedurende 20 minuten gedompeld in een daartoe geschikte lak (brillant lak van Sikkens, Sassenheim) waaraan een weinig siccatief is toegevoegd. Daarna worden de diagrammen aan beide zijden met een glazen staaf voorzichtig afgestroken en gedurende de nacht te drogen gehangen. De optische dichtheid wordt daarna van punt tot punt bepaald door het diagram langs een spleet van 35×0.5 mm, waardoor groen licht valt, verkregen met behulp van een lampje (6 V, 4.5 A) in combinatie met een lens en een groen filter, te bewegen. De in gebruik zijnde fotometer is schematisch weergegeven in fig. 5. Wanneer er voor wordt gezorgd, dat het groene filter een doorlaatbaarheid heeft in hetzelfde golflengte gebied als de absorptieband van azocarmijn-B blijkt de extinctie evenredig te zijn met de concentratie van deze kleurstof, mits de extinctie een waarde van 0.7 tot 0.8 niet te boven gaat. Wij hebben dit gevonden, door van verschillende verdunningen van een bepaald serum telkens 0.1 ml op

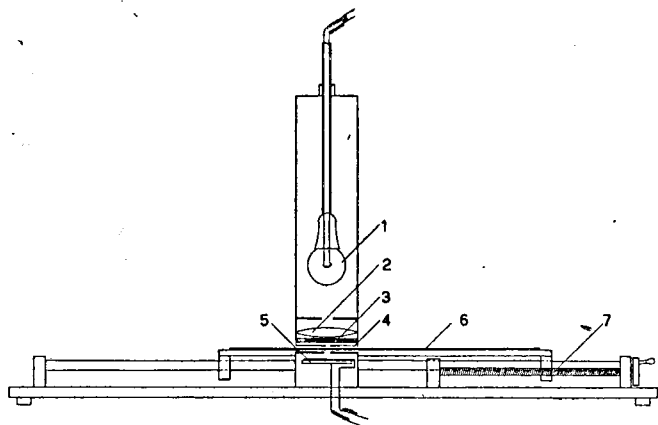


Fig. 5. Schema van de photometer.

- 1: lamp (6 V, 4,5 A).
- 2: lens.
- 3: groen filter.
- 4: spleet, $35 \times 0,5$ mm.
- 5: seleniumcel.
- 6: electrophorese diagram.
- 7: schroef, waarmee het diagram langs de spleet wordt verplaatst, 1 omwenteling ~ 1 mm.

een strookje in bufferoplossing gedrenkt filtreerpapier te brengen, en deze stroken op de gewone manier te kleuren. Van de verkregen diagrammen werd in de fotometer om de millimeter de extinctie bepaald. Door de gevonden punten werd een lijn getrokken, waarna met een planimeter de oppervlakte van de verkregen figuren werd bepaald. Deze oppervlakten werden daarna uitgezet tegen de concentratie van de serumverduunning, waarbij de kleinste concentratie willekeurig gelijk aan 1 werd gesteld. De verkregen grafiek is afgebeeld in fig. 6.

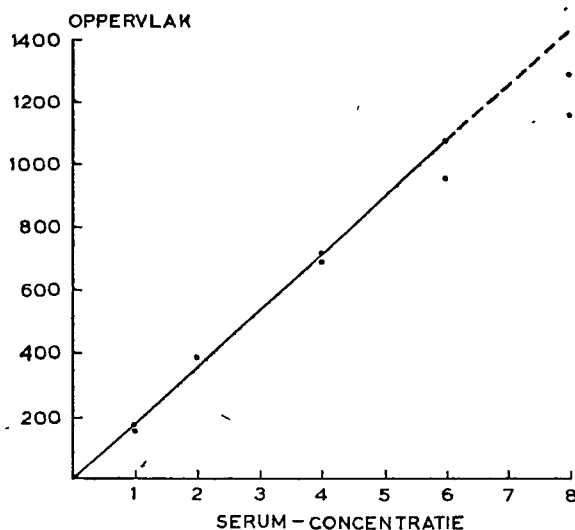


Fig. 6. Verband tussen hoeveelheid serum-eiwit en de lichtabsorptie, uitgedrukt in de oppervlakte van de fotometercurven in mm^2 .

Men ziet, dat door de punten behorende bij de concentraties 1, 2 en 4 zeer goed een rechte lijn kan worden getrokken. Een van de punten behorende bij de concentratie 6 ligt eveneens op deze lijn, die behorende bij de concentratie 8 vallen er geheel buiten. Nu is de maximale extinctie, gemeten bij de gekleurde band afkomstig van concentratie 6: $\epsilon_{\text{max}} = 0,8$.

Men moet dus bij de door ons gebruikte fotometer beneden deze waarde van de extinctie blijven om evenredigheid tussen hoeveelheid kleurstof en extinctie te mogen verwachten.

In fig. 7 is de grafiek weergegeven, verkregen door fotometreeren van het bovenste diagram van fig. 4. Door het trekken van verticale lijnen is het verdeeld in oppervlakten behorende bij resp. albumine, α_1 , α_2 , α_2' , β en γ globuline. Door deze oppervlakten op te meten met een planimeter en te delen door het totale oppervlak vindt men het percentage van het albumine en van de globulinen. In tabel I vindt men de uitkomsten behorende bij de diagrammen van fig. 4.

Van het varkens- en paardenserum zijn twee diagrammen gemaakt. Men ziet, dat hierbij de gevonden waarden in het algemeen goede overeenstemming vertonen.

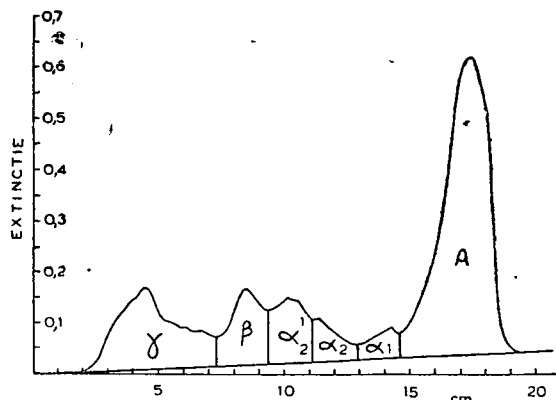


Fig. 7. Fotometercurve van electrophorese diagram van menselijk serum.

Tabel I.
Percentages albumine en globulinen.

Diersoort	Albumine	Globuline				
		α_1	α_2	α_2'	β	γ
mens	55	4	5	7	10	20
varken	51,7		15,3		15,6	17,4
	53,0		15,5		14,1	17,4
paard	31,8		19,8		14,0	34,6
	32,2		21,0		11,7	34,9

Er zij op gewezen, dat de hier gegeven berekening van het percentage eiwit uit de gevonden hoeveelheid kleurstof slechts dan juist is, als alle serum-eiwitten dezelfde hoeveelheid kleurstof per gewichtseenheid binden. Is dit niet het geval, dan moet men voor elk eiwit het oppervlak met een factor vermenigvuldigen. Voor vergelijkingsdoeleinden is de hier gevolgde methode in ieder geval zeer goed bruikbaar.

Tenslotte nog de volgende opmerking. Men krijgt op ieder diagram altijd een zekere ondergrond te zien. Kunkel en Tiselius⁴⁾ hebben aangetoond, dat deze ondergrond niet veroorzaakt wordt door adsorptie van eiwit aan het papier, maar afkomstig is van een kleine hoeveelheid van verschillende eiwitten met alle mogelijke bewegelijkheden, die naast de hoofdfracties aanwezig zijn. Om dit aan te tonen werd de electrophorese op een vel papier eerst in een bepaalde richting uitgevoerd, en daarna gedurende evenlange tijd loodrecht op de eerste richting. Het diagram bleek zich daarna te bevinden op de bissectrice van de rechte hoek, door de twee rich-

tingen van electrophorese ingesloten. Zou er adsorptie aan het papier plaatsvinden, dan zou men ook buiten deze lijn nog eiwit moeten aantreffen.

b. Theoretische beschouwingen.

Nu wij gezien hebben, dat de papierelectrophorese gebruikt kan worden voor de quantitative bepaling van serum-eiwitten willen we ons thans afvragen, of de methode zich ook leent voor het bepalen van de bewegelijkheid van de ionen van deze eiwitten: Er zijn verschillende factoren, die de bepaling van de bewegelijkheid bemoeilijken: 1. de electro-osmose. 2. de poriën-structuur van het papier. 3. de verschillen in de specifieke geleidbaarheid van de gebieden waar zich wel en geen eiwit bevindt.

We zullen deze factoren een voor een aan een nadere beschouwing onderwerpen.

1. De electro-osmose.

Door de aanwezigheid van een negatieve lading op het papier treedt er tijdens de electrophorese een vloeistofstroming op, die gericht is naar de kathode. Dientengevolge is de schijnbare verplaatsing van de negatieve eiwit-ionen des te kleiner, naarmate dit electro-osmotische effect groter is. Om de werkelijke verplaatsing te kunnen vinden moet men de grootte van de vloeistofstroming bepalen door de verplaatsing van een niet geladen kolloïd, bijv. dextran⁴⁾ onder dezelfde omstandigheden te meten. Stel men vindt in een bepaalde tijd een verplaatsing d_1 van het eiwit en een verplaatsing d_2 (naar de andere kant) van het neutrale kolloïd; dan is de werkelijke verplaatsing: $d = d_1 + d_2$.

2. De poriën-structuur van het papier.

Kunkel en Tiselius hebben de volgende redenering opgesteld⁴⁾. Wanneer een ion zich door het met buffer-oplossing verzadigde filtreerpapier beweegt, dan zal de weg, die het aflegt tengevolge van de ingewikkelde poriën-structuur van het papier bijzonder bochtig zijn. Het gevolg hiervan is, dat, wanneer men een verplaatsing d van een ion waarneemt, het in werkelijkheid een langere weg d' in het papier heeft afgelegd. Het is nu mogelijk om de verhouding $\frac{d'}{d}$ voor een bepaalde papiersoort te bepalen.

Daartoe weegt men een strook papier, drenkt hem met bufferoplossing, meet de weerstand en de lengte en weegt nog eens. Uit de gewichtsvermeerdering ΔG , de lengte l van de strook en het specifieke gewicht s van de bufferoplossing volgt dan voor de in het papier beschikbare doorsnede q van de bufferoplossing:

$$q = \frac{\Delta G}{ls}$$

Is de specifiek geleidbaarheid van de bufferoplossing κ , dan zou de weerstand van de strook moeten zijn:

$$R = \frac{l}{\kappa \cdot q}$$

Men vindt echter een grotere weerstand R' , omdat de weg l' , die het ion in het papier doorloopt lager is. Men kan deze lengte l' uit de gevonden weerstand berekenen:

$$R' = \frac{l}{\kappa} \cdot \frac{l'}{q}$$

Heeft men $\frac{l'}{l}$ eenmaal bepaald, dan geldt natuurlijk $\frac{d'}{d} = \frac{l'}{l}$ of $d' = d \cdot \frac{l'}{l}$.

Willen we nu de bewegelijkheid van een eiwit ion berekenen, dan geldt volgens de definitie van de bewegelijkheid:

$$u = \frac{d'}{t} : \frac{V}{l'} = \frac{d' l'}{t V}$$

Hierin is u = bewegelijkheid van het eiwit ion
 d' = werkelijke verplaatsing van het eiwit ion

$$\frac{V}{l'} = \text{veldsterkte in Volt/cm}$$

Nu is $l' = l \cdot \frac{l'}{l}$ en $d' = d \cdot \frac{l'}{l}$

$$\text{zodat } u = \frac{d l}{t V} \left(\frac{l'}{l} \right)^2$$

We zien dus, dat de bewegelijkheid, die men uit l en d zou berekenen te klein is, aangezien men nog moet vermenigvuldigen met $\left(\frac{l'}{l} \right)^2$. Volgens Kunkel en Tiselius bedraagt de factor $\frac{l'}{l}$ voor drie bepaalde papiersoorten resp. 1.30, 1.43 en 1.72, hetgeen voor de correctiefactor $\left(\frac{l'}{l} \right)^2$ neerkomt op resp. 1.69, 2.04 en 2.97.

3. De verschillen in specifieke geleidbaarheid.

We zullen nu trachten een inzicht te verkrijgen in de grootte van de specifieke geleidbaarheid κ in de verschillende gedeelten van het papier tijdens de electrophorese. Daartoe gaan we uit van de „beharrliche Funktion”, van Kohlrausch⁵⁾:

$$\frac{\alpha}{a} + \frac{\rho}{r} + \frac{\sigma}{s} = \Gamma(x) = \text{constant.}$$

Hierin zijn α , ρ en σ de concentraties van het positieve bufferion, het negatieve bufferion, en het negatieve eiwit ion, uitgedrukt in coulombs per cm^3 , en a , r en s de bij deze ionen behorende bewegelijkheden in cm/sec per V/cm .

α en a zijn positief, ρ , σ , r en s negatief. Deze functie $\Gamma(x)$ is uitsluitend afhankelijk van de plaats in het systeem, waarin ionentransport plaats vindt, maar is onafhankelijk van de tijd.

Wij beschouwen nu fig. 8. In fig. 8a stelt het gearceerde gedeelte het gebied van een papierstrook voor, waar zich eiwit plus bufferoplossing bevindt. Overal elders bevindt zich alleen de bufferoplossing. Wij veronderstellen, dat κ overal dezelfde waarden heeft, hetgeen in de practijk ook meestal het geval is. Na enige tijd is door electrophorese de toestand van fig. 8b ontstaan. Eensdeels is eiwit gekomen in een gebied waar het eerst niet was, anderdeels is het verdwenen uit een gebied waar het oorspronkelijk wel aanwezig was. Met behulp van de functie $\Gamma(x)$ is gemakkelijk na te gaan hoe groot κ is geworden in de verschillende gebieden. Daartoe moeten wij alleen Γ in de verschillende gebieden constant houden en bovendien de eis stellen, dat de oplossing electrisch neutraal blijft. Wij vinden dan⁶⁾:

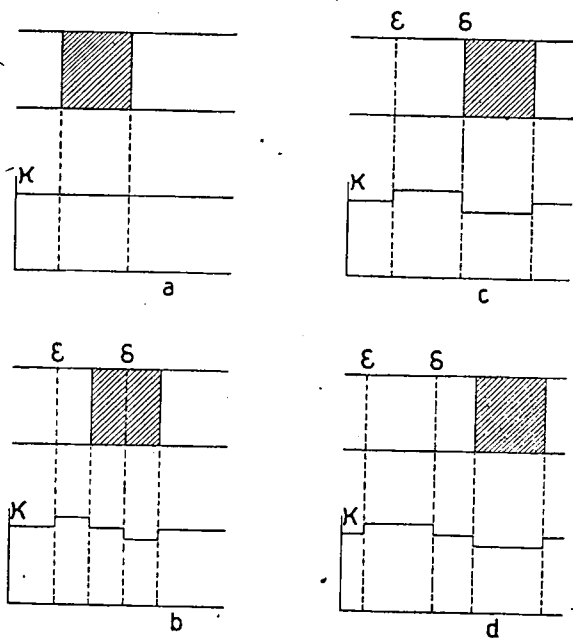


Fig. 8. De specifieke geleidbaarheid κ in de verschillende delen van het papier.
a: de begintoestand;
b; c en d: de toestand na verloop van tijd.

$$\kappa_e = \kappa_b + \frac{(r-s)(a-s)}{s} \sigma = \kappa_b + f\sigma$$

Hierin is κ_0 = spec. geleidbaarheid ter plaatse van eiwithoudende oplossing.

κ_b = spec. geleidbaarheid van de bufferoplossing.

$f \sigma = \frac{(r-s)(a-s)}{s} \sigma$ is vanwege de afspraak

over het teken van de hierin voorkomende grootheden negatief. Hieruit volgt dat wanneer we een gebied van constante $\Gamma(x)$ beschouwen de daarin voorkomende bufferoplossing een grotere κ moet hebben dan de eiwithoudende oplossing. Dit is in fig. 8b grafisch weergegeven. Aan de oorspronkelijke grenzen van de eiwitoplossing treden derhalve sprongen in κ (en dus ook in de concentraties) op. Aangezien hetgeen hier is beschreven geheel analoog is aan de electrophorese in een U-buis, hebben we bij de oorspronkelijke grenzen de letters δ en ε geplaatst. Hiermede is dus tevens de aard van de concentratiesprongen, aan wat men gewoonlijk „ δ en ε -boundary” noemt, duidelijk gemaakt.

Laten we de electrophorese nog langer plaats vinden, dan treden achtereenvolgens de toestanden c en d van fig. 8 op. Belangrijk hierin is vooral, dat κ ter plaatse van het eiwit kleiner blijft dan die van de bufferoplossing. Daardoor is de veldsterkte ter plaatse van het eiwit groter dan men uit de κ van de bufferoplossing zou verwachten. Berekent men daarom de bewegelijkheid van het eiwit met behulp van de veldsterkte in de bufferoplossing, dan vindt men een te hoge waarde.

Met behulp van de hier gegeven theorie kunnen enkele experimenteel gevonden feiten gemakkelijk worden verklaard. In de eerste plaats is het opvallend, dat in fig. 7 de piek voor het albumine behoorlijk scheef is. Dit heeft de volgende oorzaak. Uit fig. 8d zien we, dat een eiwit, dat door diffusie in de omringende bufferoplossing terecht komt, daardoor in een gebied van grotere κ en dus kleinere veld-

sterkte komt, zodat het langzamer gaat lopen. Daardoor blijft de voorkant van de eiwitband scherp en wordt de achterkant steeds verder uit elkaar getrokken. Vandaar de scheve fotometercurve. Wij zien nu tevens, dat het volstrekt ongeoorloofd is door een dergelijke principieel scheve kromme een gausskromme te leggen zoals wel wordt gedaan bij het opmeten van de oppervlakken⁷⁾.

In de tweede plaats heeft men veelal gevonden, dat de snelheid van bijv. het albumine niet constant is, maar in de loop van de tijd kleiner wordt. Dit is verklaarbaar, doordat de eiwitband tengevolge van het zojuist beschreven effect in combinatie met diffusie steeds breder wordt. Wij zien gewoonlijk, dat de albumine-band tenslotte ca. $2 \times$ zo breed wordt als het eiwitstreepje, dat oorspronkelijk werd aangebracht. Daardoor wordt de concentratie van het eiwit en dus het verschil tussen κ_0 en κ_b steeds kleiner, waardoor de snelheid eveneens geringer wordt.

Hoe groot de effecten zijn waar het hier om gaat kan men gemakkelijk zien aan de diagrammen van

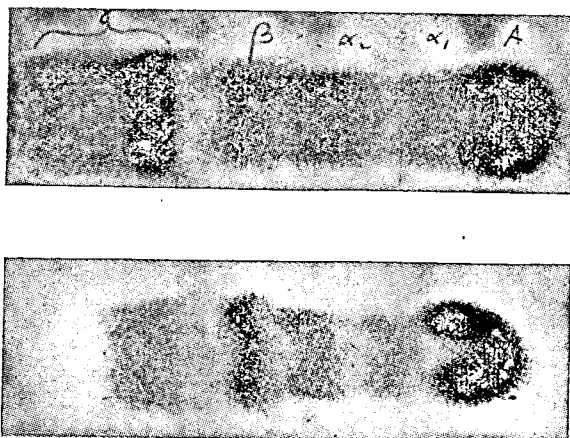


Fig. 9. Twee diagrammen van menselijk serum.
Boven: van een myeloom patient.
Onder: tijdens de zwangerschap.

fig. 9. Deze zijn verkregen, door een streepje serum niet over de gehele breedte van het papier aan te brengen, maar slechts over de helft van de breedte. Daardoor bevindt zich rondom het gebied, waar het eiwit zich bevindt, overal bufferoplossing. Deze kan daardoor in de zijkant van de eiwitbanden diffunderen, waardoor de verlaging van κ ter plaatse van het eiwit te niet wordt gedaan. Vandaar de sterk gebogen albumine-banden: de snelheid in het midden van de band is groter dan die aan de kanten. Het verschil in snelheid is van de orde van 10%, hetgeen dus tevens een maat is voor de verandering in κ die kan optreden. Een effect van deze orde laat zich ook berekenen uit de bekende albumine- en bufferconcentraties.

Tenslotte nog de verklaring van een effect bij het diagram van serum van een myeloom patiënt uit fig. 9. Hier zien we, dat de sterke band in het gebied van γ -globuline evenals de albumineband gekromd is, maar juist andersom. Om de oorzaak hiervan te begrijpen zijn in fig. 10 twee fasen van de electrophorese van een mengsel van twee eiwitten weergegeven.

Het verloop van κ in fig. 10a is vooral van belang. Dit verloop is uit fig. 8 door extrapolatie af

te leiden. Wij zien nu, dat tengevolge van het voortlopen van het ene eiwit de κ ter plaatse van het andere eiwit toeneemt, zodat de snelheid afneemt. Tengevolge van diffusie kan de zijkant van de band

den is gericht. In het midden is dus de stroomsnelheid nul.

We beschouwen een stuk van het papier met een lengte x , gerekend van het midden M af (fig. 11).

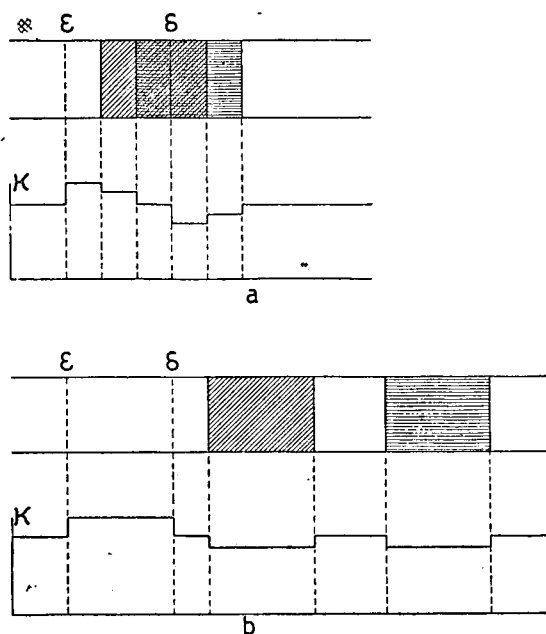


Fig. 10. De specifieke geleidbaarheid κ bij aanwezigheid van twee soorten eiwit. a: kort na het begin van de electrophorese; b: na enige tijd.

een lagere κ en dus een grotere snelheid krijgen, zodat het effect van de diffusie voor het langzame eiwit juist andersom is als voor het snelle eiwit. Het beschreven effect zal natuurlijk het sterkst zijn voor de zeer langzaam lopende eiwitten.

Conclusie.

Resumerende kunnen we het volgende zeggen. Met behulp van papierelectrophorese kan men serum-eiwitten van elkaar scheiden en ze kwantitatief bepalen met een redelijke nauwkeurigheid.

De bepaling van de bewegelijkheid van de eiwitten is langs deze weg wegens de behandelde theoretische complicaties echter nauwelijks aan te bevelen. Het spreekt vanzelf, dat de methode van de papierelectrophorese ook op andere eiwitten kan worden toegepast.

Supplement.

Quantitatieve berekening van het effect der vloeistofstroming in het filtreerpapier tengevolge van verdamping.

Naar aanleiding van de opmerking van de heer Brouwer (zie discussie) over de vloeistofstroom in het papier tengevolge van verdamping heb ik, ook al omdat Prof. Macheboeuf geen kwantitatieve gegevens hierover verstrekt, de volgende berekening uitgevoerd.

Wij veronderstellen, dat uit het filtreerpapier per seconde de fractie a van de daarin aanwezige vloeistof verdampft. Door de capillaire krachten zuigt het papier nieuwe vloeistof aan, zodat een vloeistofstroom ontstaat, die van de uiteinden naar het mid-

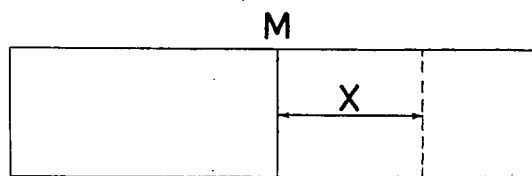


Fig. 11.

Aangezien de daarin aanwezige vloeistof per sec met de fractie a vermindert zal in de tijd dt deze fractie $a dt$ bedragen. Dientengevolge trekt de vloeistof zich terug over een afstand dx :

$$dx = -ax dt$$

of wel:

$$\frac{dx}{dt} = v_x = -ax \dots \dots \dots (1)$$

Hierin is v_x de snelheid, waarmee de vloeistof zich verplaatst op de plaats x . Het minteken geeft aan, dat v_x en x tegengesteld gericht zijn.

Wij berekenen nu de verplaatsing, die een eiwit ondergaat tengevolge van de gecombineerde werking van een elektrisch veld en de vloeistofstroom.

Stel de snelheid in het elektrisch veld is v .

Dan is de totale snelheid op een afstand x van het midden:

$$v_{tot.} = v + v_x = v - ax \quad (2)$$

De verplaatsing in de tijd dt is dus:

$$dx = (v - ax) dt \quad (3)$$

Stel het eiwit is op de tijd $t=0$ op de plaats $x = x_1$. Integreeren we de vergelijking (3):

$$\int_{x_1}^x \frac{dx}{v - ax} = \int_0^t dt,$$

dan vinden de tenslotte voor de verplaatsing, die het eiwit ondergaat in t sec:

$$x - x_1 = \frac{v - ax_1}{a} (1 - e^{-at}) \dots \dots \dots (4)$$

In deze vergelijking is a de fractie van de in het papier aanwezige vloeistof, die in de tijd t verdampft is. Stellen we $at = y$ dan kan (4) ook geschreven worden:

$$x - x_1 = (v - ax_1) t \frac{(1 - e^{-y})}{y} \dots \dots \dots (5)$$

Stellen we tenslotte $\frac{(1 - e^{-y})}{y} = z$ dan is

$$x - x_1 = (v - ax_1) tz \quad (6)$$

Uit deze vergelijking kunnen we de volgende conclusies trekken:

1. Voor kleine waarden van y geldt bij benadering: $z = 1$.

Dan is dus:

$$x - x_1 = (v - ax_1) t.$$

Is bovendien nog $x_1 = 0$ dan:

$$x = vt.$$

2. Voor grote waarden van y nadert z tot $1/y$.

Dan:

$$x - x_1 = \frac{v - ax_1}{y} t = \frac{v - ax_1}{a} = \frac{v}{a} - x_1$$

of:

$$x = \frac{v}{a} = \text{constant}$$

Deze constante waarde is onafhankelijk van de oorspronkelijke plaats van het eiwit en wordt bereikt:

a. bij geringe verdamping na lange tijd; $x - x_1$ is dan groot.

b. bij sterke verdamping na korte tijd; $x - x_1$ is klein.

3. Wij berekenen de onderlinge afstand, die twee eiwitten p en q na de tijd t ten opzichte van elkaar krijgen:

$$\begin{aligned} x_p - x_1 &= (v_p - ax_1) t \\ x_q - x_1 &= (v_q - ax_1) t \\ \frac{x_p - x_1}{x_p - x_q} &= \frac{(v_p - ax_1) t}{(v_p - v_q) t} \end{aligned} \quad (7)$$

Uit vergelijking (7) volgt, dat de afstand $x_p - x_q$ onafhankelijk is van de plaats, waar men het mengsel van de eiwitten op het papier heeft gebracht.

De factor z bepaalt, in hoeverre of de onderlinge afstand zal afwijken van de afstand, die men bij afwezigheid van stroming zou vinden. Om een indruk te geven van deze afwijking vindt men hieronder de waarde van z , behorende bij enkele waarden van de fractie y , die in totaal is verdampt.

$y = 0.1$	$z = 0.95$
$y = 0.2$	$z = 0.91$
$y = 0.3$	$z = 0.86$
$y = 0.4$	$z = 0.82$
$y = 0.5$	$z = 0.79$

Bij de door ons uitgevoerde experimenten bedraagt de totale verdamping ongeveer 40 %, zodat $y = 0.4$. De afstand tussen de eiwitten is dus na beëindiging van het experiment 18 % kleiner, dan zonder verdamping het geval zou zijn.

Uit vergelijking (7) volgt nog, dat bij aanwezigheid van 3 of meer eiwitten de verhouding van de onderlinge afstanden onafhankelijk van de tijd en van de verdampingssnelheid is. Men ziet dit gemakkelijk in, door (7) voor 2 paar eiwitten op te schrijven en de vergelijkingen op elkaar te delen.

Tenslotte zij nog opgemerkt, dat het nulpunt van de vloeistofstroom tengevolge van de electro-osmose niet in het midden van het papier ligt. De plaats hiervan kan worden berekend uit:

$$v_e + v_x = 0 \text{ of wel } v_e - ax = 0, \text{ zodat}$$

$$x = \frac{v_e}{a}$$

Hierin is v_e de snelheid van de electro-osmotische stroming. Bij de door ons gebruikte opstelling ligt het nulpunt enkele cm buiten het horizontale deel van het papier.

Discussie:

Dr. J. A. Smit:

Het experiment levert een grafiek van de kleurstofconcentratie als functie van de plaats. Als criterium voor de concentratie van een bepaald eiwit wordt genomen de oppervlakte onder het desbetreffende deel van de genoemde grafiek, zijdelings begrensd door rechte lijnen. Speelt de bijdrage van de naburige eiwitten tot dit oppervlak niet een belangrijke rol?

Antwoord:

Dit kan ongetwijfeld het geval zijn. Daarom tracht men electrophorese diagrammen veelal te ontleden in een aantal gausskrommen. Deze methode is echter voor de interpretatie van de bij papierelectrophorese verkregen grafieken niet geschikt om de volgende redenen:

1. Zoals ik theoretisch afgeleid en experimenteel gevonden heb zijn de pieken, behorende bij een bepaald eiwit, scheef.
2. De serum-eiwitten bestaan niet alleen uit albumine en α -, β - en γ -globuline, maar bovendien uit een groot aantal componenten in kleine concentratie, die in het diagram gesuperponeerd worden op de hoofdcomponenten. Daar komt nog bij, dat γ -globuline niet een enkele component, maar een mengsel van verschillende eiwitten is.

De door ons toegepaste methode om de hoeveelheid van de voornaamste serum-eiwitten te bepalen is zeker niet exact. Het is echter op grond van het bovenstaande nauwelijks mogelijk een betere methode aan te geven.

Dr. A. J. van Duuren:

Is de verhouding van de afstanden van bepaalde eiwitfracties op het filtreerpapier tot de oorsprong enigermate reproduceerbaar? Zo niet, is in een pathologisch serum een bepaalde fractie dan nog wel te karakteriseren?

Antwoord:

De verhouding van de afstanden is zeker aan schommelingen onderhevig, bijv. door de verandering, in de specifieke geleidbaarheid bij verschillen in concentratie van een bepaalde fractie. Het geheel verandert daardoor niet zozeer, dat men niet meer zou weten met welke fractie men te doen heeft.

Dr. J. A. Niemeyer:

Bij welke eiwitconcentratie zijn effecten van „tailing” ten gevolge van verandering van κ noemenswaard t.o.v. die door heterogeniteit der eiwitfractie. Op het lab. voor physiologische chemie te Utrecht vindt men nl. bij fotometreeren practisch symmetrische toppen.

Antwoord:

Zoals reeds aangegeven bedraagt het verschil in κ voor de albuminefractie ongeveer 10 %. Bij kleinere concentraties zoals die van de globulinen, zal het effect van de heterogeniteit overheersen. Waarom de heer Niemeyer symmetrische toppen vindt is niet duidelijk. Het zou kunnen liggen aan de temperatuur. Voert men nl. de electrophorese bij lagere temperatuur uit dan is de diffusie geringer en dus de asymmetrie van de fotometercurve kleiner.

Dr. F. L. J. Jordan:

Is er een verschil te zien tussen het diagram van onverwarmde en van gedurende 10 tot 30 minuten op 60° C gebrachte „geïnactiveerde” sera? Dit zou belangrijk kunnen zijn, omdat verschillende biologische eiwitfuncties door „inactivering” veranderd worden.

Antwoord:

Hiervan is mij niets bekend. De proef zou gemakkelijk kunnen worden uitgevoerd.

D. M. Brouwer:

Als vierde storend effect bij het bepalen van de beweeglijkheden moet genoemd worden de vloeistofstroming, die ten gevolge van verdamping in het papier ontstaat.

Antwoord:

Dit effect is er ongetwijfeld. Bij de beschreven apparatuur zal het betrekkelijk klein zijn, omdat het apparaat zeer goed is gesloten en in een kamer van constante temperatuur is opgesteld. Nadere behandeling vindt U in het supplement van mijn voordracht.

Dr. W. Th. G. M. Smeets:

Kan de verdamping van water uit papier geen invloed hebben op de achtergrond van het diagram?

Antwoord:

Waarschijnlijk niet. Deze invloed zou alleen bij grote concentratieveranderingen zijn te verwachten en deze treden zeker niet op.

¹⁾ Tiselius, A., Biochem. J. 31, 1464 (1937).

²⁾ Durrum, E. L., J. Am. Chem. Soc. 72, 2943 (1950).

³⁾ Turba, F. en Enenkel, H. J., Naturwissenschaften 37, 93 (1950).

⁴⁾ Kunkel, H. G. en Tiselius, A., J. Gen. Physiol. 35, 89 (1951).

⁵⁾ Kohlrausch, F., Ann. der Physik und Chemie 62, 209 (1897).

⁶⁾ Wael, J. de en Wegelin, E., Rec. trav. chim. 71, 1035 (1952).

⁷⁾ Grassmann, W. en Hannig, K., Z. physiol. Chem. 290, 1 (1952).

Microélectrophorèse sur papier, avec évaporation continue du solvant (électrorhéophorèse)

Michel Machebœuf

541.18 : 537.36

Professeur à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris.
Chef de Service à l'Institut Pasteur.

L'électrophorèse dans le papier avec évaporation continue du solvant diffère de l'électrophorèse ordinaire. Les ions cheminent au sein d'un contre-courant liquide dont la vitesse est d'autant plus grande qu'ils sont plus éloignés d'une „ligne neutre” où le flux du liquide est nul. Chaque ion est finalement immobilisé en un point où il rencontre un débit liquide opposé à sa vitesse de cheminement électrophorétique. Ceci permet de faire cheminer en sens inverses et se rencontrer deux substances quelconques (même si elles ont même signe électrique). On peut ainsi étudier, sur de très petits échantillons, les interactions de protéines, d'ions et même de molécules diverses. Des applications sont envisagées en immunologie et en microchimie analytique.

Tous les auteurs qui ont essayé de mettre au point des techniques d'électrophorèse au sein du papier se sont préoccupés d'empêcher ou tout au moins de minimiser l'évaporation de l'eau au niveau du papier.

Certains ont, pour cela, maintenu la feuille de papier entre des plaques de verre et ont même plongé l'ensemble dans un liquide organique non miscible à l'eau, tel que le chlorobenzène^{2) 5)}.

D'autres auteurs se sont contentés, comme Durrum³⁾ et comme nous-mêmes⁶⁾ de maintenir le papier pendant toute l'expérience dans un espace clos en le recouvrant par un vase de verre renversé. Ce dispositif n'empêche pas totalement l'évaporation, car on constate une abondante condensation d'eau sur les parois du vase de verre qui joue le rôle de paroi froide pour la vapeur d'eau émise par le papier humide que chauffe le courant électrique.

L'évaporation qui se produit ainsi au niveau de la feuille de papier joue un rôle capital dans le déplacement des protéines. Nous allons voir que cette action de l'évaporation peut être utile dans beaucoup de cas et ceci nous a conduit à chercher à la régulariser plutôt qu'à la supprimer.

Des applications fructueuses peuvent découler de cette étude.

Envisageons ce qui se passe au sein du papier pendant l'électrophorèse telle que la pratiquent Durrum³⁾ ou nous-mêmes⁶⁾ 4).

La bande de papier, soutenue en son milieu par un chevalet C est en contact, par chacune de ses extrémités, avec une même solution tampon contenue dans les bacs B et B'. Un vase renversé V coiffe l'ensemble

afin de maintenir le papier dans une enceinte close. Le liquide au sein du papier est chauffé légèrement par le courant électrique; de l'eau distille donc depuis le papier jusqu'aux parois du vase V. L'eau évaporée sera constamment remplacée par du liquide tampon puisé dans les bacs B et B'. Il y aura donc un double mouvement liquide de B vers S et de B' vers S. Le débit de cet écoulement ne sera pas le même à tous les niveaux du papier. En effet, à travers une section du papier très proche de B, devra passer tout le liquide nécessaire pour compenser l'évaporation sur l'ensemble BS, tandis qu'à travers une section située par exemple au niveau du point P, le liquide qui passera sera seulement celui nécessaire à compenser l'évaporation dans la partie du papier située au-dessus de P. Enfin, s'il n'existait aucune cause de mouvement du liquide dans le papier autre que l'évaporation, le flux liquide serait nul au point S; mais le champ électrique produit au sein du papier un écoulement de liquide par électroendosmose. Cet écoulement transporte du liquide dans le sens B'B, c'est-à-dire de l'électrode positive vers l'électrode négative. L'écoulement dû à l'électroendosmose est le même à tous les niveaux du papier entre B et B'.

En somme, le liquide contenu dans le papier se déplace en fonction de la somme algébrique de deux écoulements, l'un dû à l'évaporation pendant l'électrophorèse et le deuxième dû à l'électroendosmose. Ce dernier écoulement déplace donc vers la gauche la position du point où le débit aqueux est nul. C'est donc au niveau d'un point π situé à 30 ou 40 mm du sommet S du côté de l'électrode négative que le liquide est immobile dans le papier. Partout ailleurs dans le papier, le liquide se déplace avec une vitesse d'autant plus grande que le point considéré est plus éloigné de π . Le sens du déplacement n'est pas le même, de part et d'autre du point π car le liquide se dirige constamment vers ce point. Supposons donc que nous disposions sur le papier en un point P une petite quantité d'une substance hydrosoluble non électrolyte. Cette substance, insensible au champ électrique, suivra passivement les déplacements du liquide et elle sera finalement transportée au point π , quelle que soit la position du point initial P.

Il est facile de vérifier ce fait en disposant sur le papier, à des niveaux divers, des gouttelettes, d'une solution de glucose, puis en laissant agir le champ électrique pendant un temps suffisant (six heures par

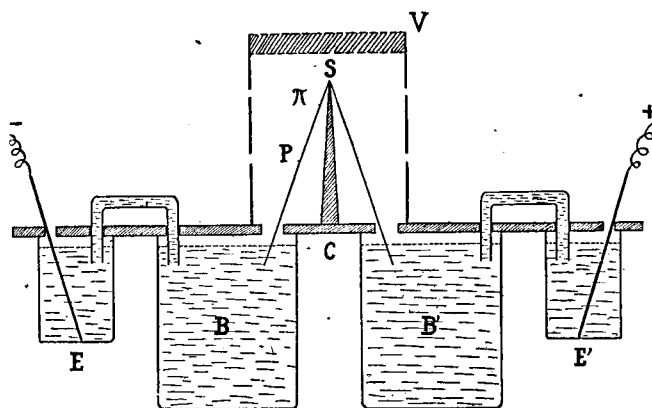


Fig. 1.

Schéma de l'appareil pour microélectrophorèse sur papier.

exemple). On révèle ensuite la position des spots de glucose par une réaction colorée convenable telle que celle due au phtalate d'aniline⁷). On trouve que tout le glucose s'est rassemblé sur une ligne $\pi\pi'$ parallèle à la ligne médiane SS' du papier, mais située 30 à 40 mm plus à gauche.

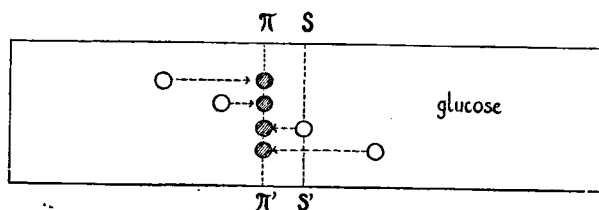


Fig. 2.

Sur la figure 2, nous avons indiqué par des cercles les points où avaient été déposées 4 gouttes d'une solution de glucose et par des taches noires les points où fut retrouvé le glucose après 7 heures. Des flèches indiquent dans chaque cas le chemin parcouru par le glucose. On voit que le sucre se déplace de gauche à droite ou au contraire de droite à gauche suivant qu'il a été placé à gauche ou bien à droite de la ligne $\pi\pi'$ sur la quelle il se trouve finalement transporté.

Si, au lieu d'une substance non ionisable, telle que le glucose, on dépose sur le papier une substance ionisable, les ions subiront un déplacement électrophorétique par rapport au liquide contenu dans le papier. Mais comme ce liquide est lui-même en mouvement, le déplacement des ions par rapport au papier correspondra à la somme algébrique du déplacement électrophorétique et du déplacement du liquide dans le papier.

Désignons par x la distance d'un point du papier à la ligne $\pi\pi'$, x étant affecté du signe négatif si le point est à gauche de $\pi\pi'$ et du signe positif si le point est à droite; ε étant la vitesse du déplacement électrophorétique d'un ion de protéine par rapport à l'eau qui le contient, e étant la vitesse du mouvement de l'eau dû à l'électroendosmose, E étant la vitesse au point x du mouvement de l'eau occasionné par l'évaporation.

ε et e sont indépendantes de x , mais E est fonction de x (la valeur absolue de E croît lorsque x croît).

Désignons par V la vitesse de la protéine par rapport au papier. Nous pouvons écrire:

$$(1) \dots \dots V = \varepsilon + e + E$$

Supposons par exemple que le pH du liquide soit supérieur à l'isoélectrique de la protéine, les ions protéiques cheminent donc vers l'électrode positive, c'est-à-dire vers la droite dans tous nos schémas; ε est donc positive. Au contraire, le courant d'électroendosmose fait déplacer l'eau dans le papier vers l'électrode négative, donc e est négative.

E est négative dans toute la partie du papier située à droite de la ligne $\pi\pi'$, mais E est positive dans la partie située à gauche de $\pi\pi'$.

L'équation (1) nous fait prévoir que pour la protéine étudiée, il peut y avoir, dans le papier, un point pour lequel la protéine aura une vitesse V nulle. Il suffit pour cela que $|E| + |e| = |\varepsilon|$, ce qui doit se produire puisque e et ε sont invariables tandis que $|E|$ croît avec x .

Si donc nous disposons des molécules de la protéine en π elles doivent se déplacer vers l'électrode positive,

mais en s'éloignant ainsi de π elles sont de plus en plus freinées par le mouvement liquide de plus en plus rapide et de sens opposé. Elles parviennent finalement en un point où le courant liquide équilibre exactement le déplacement électrophorétique. Ce point ne peut pas être dépassé par les molécules protéiques considérées. Mais des molécules dont la mobilité électrophorétique serait plus grande iraient plus loin et s'arrêteraient en un autre point dont la position correspond à leur vitesse électrophorétique. Si une molécule protéique était déposée au delà du point qui correspond à sa mobilité électrophorétique, elle rétrograderait car elle se trouverait entraînée en arrière par le déplacement du liquide dont la vitesse serait supérieure à celle du déplacement électrophorétique.

En somme, grâce au déplacement du liquide dont la vitesse varie en fonction de l'éloignement, chaque type électrophorétique de protéine se trouve transporté, puis stocké en un point différent caractéristique.

Une conclusion qui peut paraître surprenante est la suivante: la position définitive d'une protéine est indépendante de sa position initiale et de la durée de l'expérience, à condition que cette durée ait été suffisante pour que l'équilibre soit atteint.

Une expérience très simple permet de vérifier ces conclusions:

Sur une bande de papier, on dépose en chacun des trois points indiqués par des croix, une gouttelette d'une solution d'une protéine de mobilité moyenne (α_2 globulines de sérum par exemple). Au point indiquée par un petit triangle, on dépose une gouttelette d'une solution de glucose qui servira de témoin pour repérer la position de la ligne $\pi\pi'$ où le mouvement du liquide est nul. Après 8 heures d'électrophorèse, on révèle le spot de glucose par du phtalate d'aniline, puis les spots de protéines par la méthode habituelle avec une solution alcoolique de bleu de bromophénol et de chlorure mercurique. On obtient l'aspect dans la figure 3 où les spots de protéines

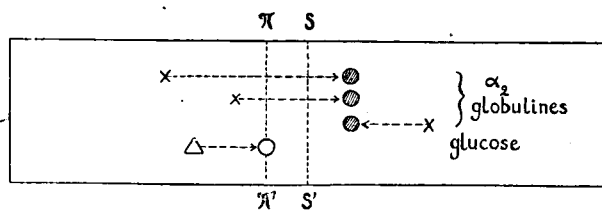


Fig. 3.

sont indiqués par des disques noirs et le spot de glucose par un simple cercle.

Si la protéine utilisée a une mobilité électrophorétique moins grande, elle est retrouvée finalement moins loin de $\pi\pi'$. Si, au contraire, sa mobilité est plus grande, la protéine est retrouvée plus loin de $\pi\pi'$. Si la mobilité de la protéine est trop grande et l'évaporation insuffisamment intense, le spot de la protéine peut dépasser les limites du papier.

On pouvait se demander si le chevalet qui soutient le papier joue un rôle dans les phénomènes que nous venons de décrire. En effet, ce chevalet subdivise le papier en deux parties inversement inclinées. Nous avons donc réalisé quelques essais en utilisant un papier maintenu horizontal (technique dite du papier à plat). Les résultats furent pratiquement les mêmes

que pour la technique avec chevalet, à condition que l'évaporation ait une intensité analogue.

Par contre, lorsque nous avons fait des essais en opérant au sein du chlorobenzène qui évite l'évaporation, les résultats furent très différents.

1°. Les taches de protéines ne tendant pas chacune vers une position limite caractéristique; toutes les protéines tendant à s'éloigner de plus en plus de leur point de départ.

2°. La position d'une protéine après un temps donné n'est jamais indépendante de la position initiale de la protéine.

La technique avec évaporation peut présenter des avantages. En effet,

1°. Le déplacement de liquide provoqué par l'évaporation joue le rôle de contre-courant. En empêchant les protéines de sortir du papier, il permet de réaliser des expériences de longue durée qui sélectionnent remarquablement bien les molécules protéiques sans que l'absorption par le papier puisse jouer un rôle appréciable.

2°. La forme des molécules protéiques peut jouer un rôle prépondérant puisqu'il s'agit en somme d'un équilibre dynamique dans lequel les protéines qui paraissent immobiles par rapport au papier sont, en fait, en continuel déplacement par rapport au liquide. Ceci explique parfaitement un phénomène que nous avons déjà signalé (1); une protéine peut paraître homogène à l'électrophorèse ordinaire en phase liquide libre, mais se montrer très hétérogène par électrophorèse sur papier selon la technique que nous employons.

Exemple: de la sérum albumine en solution aqueuse de pH 7.3 est chauffée à 75° C pendant 10 minutes. La protéine dénaturée se comporte vis à vis de l'électrophorèse par la méthode classique de *Tiselius* comme parfaitement homogène, tandis qu'elle donne par électrophorèse sur papier des spots diffus suivis de longues traînées. Le chauffage a provoqué la formation d'agrégats de molécules en forme de chaînettes assez longues dont la forme gêne les déplacements au sein de l'eau sous l'influence du champ électrique. Comme le nombre des molécules dans un agrégat peut varier dans d'assez larges limites pour une même expérience, on conçoit que le produit soit hétérogène vis à vis de l'électrophorèse sur papier où le contre-courant réalise un excellent triage des particules protéiques suivant leur comportement lors d'un déplacement au sein d'un liquide.

Au lieu de chercher à empêcher l'évaporation, nous avons donc tenté de la régulariser.

Un avantage intéressant de l'électrophorèse avec évaporation est le suivant: Lorsqu'un ion est arrivé au point limite qui lui correspond, il ne dépasse pas ce point car il serait refoulé par un courant liquide de sens opposé à son déplacement électrophorétique et de vitesse supérieure à sa propre vitesse électrophorétique. D'autre part, si, par suite de la diffusion, ou pour toute autre cause, des ions sont en retard par rapport à certains de leur frères, le retard sera bientôt comblé puisque les retardataires ont à vaincre un courant liquide moins rapide.

Ceci explique la netteté remarquable des spots que la diffusion ne peut pas estomper progressivement comme elle le fait pour les frontières dans l'électrophorèse ordinaire. Un très gros avantage de ces faits est le suivant:

On peut réaliser des expériences d'électrophorèse de longue durée pour des ions de petite taille, très diffusibles, sans que les taches atteignent des dimensions gênantes. La diffusion dans le sens longitudinal est empêchée, seule la diffusion transversale, perpendiculaire au courant persiste. Les spots deviennent donc finalement des lignes dont les limites antérieures et postérieures restent toujours nettes.

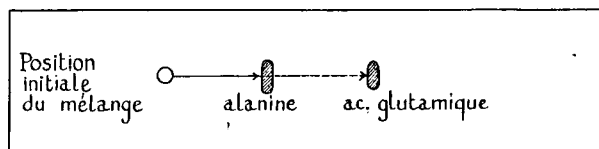


Fig. 4.

La figure ci-contre montre la séparation en deux spots très nets de deux aminoacides. Les spots sont allongés transversalement par la diffusion, mais la diffusion est empêchée dans le sens du déplacement électrophorétique.

Ceci laisse prévoir de nombreuses applications de l'électrophorèse sur papier à l'étude de substances dont les molécules ou les ions ont des tailles très inférieures à celles des protéines.

Un autre fait très important, à mon avis, est que la position finale d'un ion est indépendante du point de départ de cet ion.

Remarquons tout d'abord que l'on peut, grâce à ce fait, déposer sur le papier les substances étudiées sans prendre grand soin à la diffusion du liquide dans le papier lors du départ:

Pour le prouver, réalisons l'essai suivant (fig. 5).

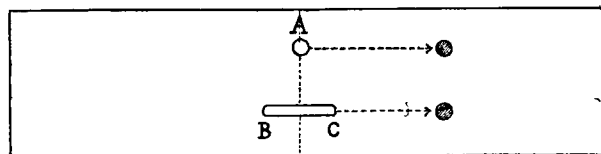


Fig. 5.

Sur une même bande de papier, déposons en A une petite tache d'une solution d'albumine à 2 %, puis en BC, déposons une longue traînée d'une solution à 0.5 % de la même protéine. Le volume de liquide déposé en BC est quatre fois plus grand que celui déposé en A, donc les masses de protéines sont égales. Laissons évoluer l'électrophorèse; on obtient finalement, comme le montre la figure, deux taches égales et situées au même niveau.

Ceci permet en particulier de comparer des solutions protéiques de concentrations assez inégales telles que le liquide céphalorachidien et le sérum d'un malade. Le liquide céphalorachidien, après dialyse qui en élimine les sels est déposé suivant une longue traînée telle que BC qui peut contenir un volume de liquide 7 à 8 fois supérieur à celui du sérum. On peut ainsi obtenir d'assez beaux électrogrammes de certains liquides céphalorachidiens pathologiques sans avoir à réaliser au préalable une difficile élimination de l'eau.

Cette technique donne également de beaux résultats pour certaines urines pathologiques.

Une autre série d'applications très fructueuses peut découler du fait suivant: On peut, sur une bande de papier, dans une expérience, faire cheminer deux spots d'une même protéine en deux sens inverses. Il

suffit de choisir les points de départ. Exemple: figure 6.

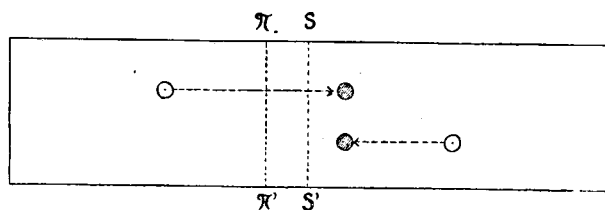


Fig. 6.

En A et B on dépose de part et d'autre d'une même bande de papier deux taches d'une même protéine (globuline β_1 du sérum sanguin) on retrouve finalement les spots a et b au même niveau, donc les déplacements furent en sens inverses.

On peut donc toujours trouver pour deux protéines différentes, deux points de départ sur une même piste tels que pendant leurs trajets, les deux protéines se croiseront (fig. 7). Si donc ces protéines peuvent réagir l'une sur l'autre, ceci sera visible sur l'électrogramme final.

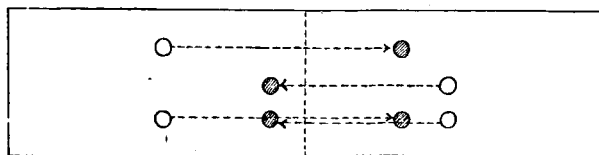


Fig. 7.

Exemple (fig. 8): en TD on dépose de la toxine diphtérique purifiée en AD on dépose l'antitoxine correspondante purifiée elle aussi. Sur la piste du haut, dans la figure 8, on voit le cheminement de la toxine lorsqu'elle ne rencontre pas l'antitoxine.

Sur la piste immédiatement inférieure de la figure, on voit le cheminement de l'antitoxine lorsqu'elle ne rencontre pas la toxine. Sur la troisième piste, on voit que la toxine (TD) et l'antitoxine correspondante (AD) se sont rencontrées et ont formé un complexe de mobilité différente C.

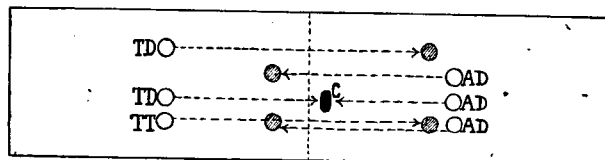


Fig. 8.

T.T. = toxine tétanique.
T.D. = toxine diphtérique.
A.D. = antitoxine diphtérique.

Sur la piste inférieure enfin, on voit que la toxine tétanique (TT) et l'antitoxine diphtérique (AD) n'ont pas réagi et se retrouvent finalement en des positions semblables à celles des bandes témoins.

Notons que dans l'exemple qui correspond à la figure 8 les proportions de toxine tétanique et d'antitoxine étaient choisies pour qu'il en n'y ait équivalence. Si l'antitoxine ou bien la toxine est en excès, il se fait des complexes solubles qui ne restent pas en C, mais se distinguent cependant très facilement de l'antitoxine ou de la toxine (ils ont une mobilité voisine de celle des globulines α_2 du sérum sanguin, tandis que la toxine migre beaucoup plus vite et l'antitoxine beau-

coup plus lentement). On peut utiliser ces faits pour déterminer très simplement les proportions équivalentes d'une toxine et de son antitoxine sur des masses infimes de ces substances.

L'électrophorèse ordinaire, type *Tiselius* et l'électrophorèse sur papier sans contre-courant dû à l'évaporation, ne permettent pas aussi facilement des applications sérologiques. On ne peut pas, comme ici, faire cheminer en sens inverses deux protéines portant des charges de même signe. Si l'on veut, dans l'électrophorèse sur papier sans évaporation, faire se rencontrer deux telles protéines, on doit profiter de la différence entre leur vitesse pour faire rattraper la plus lente par le plus rapide, mais en pratique, on doit obtenir ainsi un étalement sur une zone très vaste du papier. En effet, dès que les premières molécules de toxine rattraperont le spot le plus lent d'antitoxine, elles se trouveront en minorité par rapport aux molécules d'antitoxine; il se formera donc des complexes solubles qui sont plus rapides que l'antitoxine elle-même.

Le principe que nous venons d'envisager, c'est-à-dire la réalisation de réactions entre des ions cheminant en sens inverses sur une même piste du papier est applicable non seulement aux protéines, mais à des ions plus petits et ceci est susceptible de nombreuses applications microanalytiques qualitatives ou même quantitatives.

En mettant des proportions diverses des deux ions sur plusieurs pistes parallèles, on peut déterminer les proportions équivalentes pour qu'aucun des ions ne soit en excès par rapport à l'autre.

Ce principe est même applicable au cas où l'une des deux substances que l'on veut faire se rencontrer n'est pas un ion. En effet, les substances électriquement neutres migrent, elles aussi, dans le papier; elles sont transportées par le flux liquide vers la ligne de flux neutre (ligne π de fig. 2 et fig. 3). La fig. 9

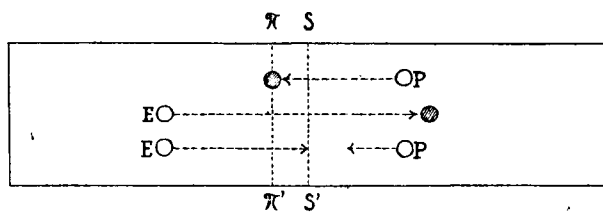


Fig. 9.

montre comment une substance non électrolyte telle qu'un polyoside neutre P se déplacerait et irait vers la ligne π . On doit pouvoir le faire rencontrer avec l'enzyme hydrolase spécifique E et observer la formation éventuelle d'un complexe enzyme-substrat dont la mobilité sera évidemment différente de celle du substrat libre.

Lorsque l'on dépose sur le papier des échantillons en des points différents du sommet médian, on risque de voir ces échantillons être entraînés et déplacés par le liquide tampon pendant son ascension lorsqu'il imbibé le papier au début de l'expérience.

On évite cet inconvénient en ne déposant les échantillons qu'après avoir fait imbiber complètement le papier. On peut opérer de diverses façons: 1°. La solution de l'échantillon est absorbée par un petit carré de papier filtre que l'on dépose sur le papier d'électrophorèse au point voulu; on laisse diffuser pendant le temps voulu, puis on enlève le carré porte-échantillon avant d'établir le contact électrique.

2°. La solution de l'échantillon (assez concentrée pour que son volume soit faible) est placée dans une pipette capillaire, on touche le papier humide avec la pointe de la pipette et l'on expulse le liquide très lentement.

Nous nous limiterons ici aux quelques exemples cités, mais on pourrait en citer beaucoup d'autres. La technique d'électrophorèse avec évaporation créant un contre-courant liquide est susceptible de nombreuses applications. Elle diffère de l'électrophorèse sans évaporation où les ions ne rencontrent qu'un faible courant liquide dont le débit est le même en tous les points du papier (courant d'électroendosmose). L'électrophorèse avec évaporation est en fait un transport par deux facteurs finalement opposés dans leurs actions: le champ électrique et le courant liquide; nous l'appelons donc *électrorhéophorèse* pour la distinguer de l'électrophorèse banale.

Mais pour que l'électrorhéophorèse donne des résultats très satisfaisants, il faut tenir compte de divers facteurs:

1°. Le liquide tampon qui grimpe dans le papier pour remplacer l'eau qui s'évapore apporte les électrolytes qu'il contient; la force ionique du liquide contenu dans le papier augmente donc progressivement tout au long de l'expérience. Il faut donc opérer avec des tampons suffisamment dilués pour que malgré l'évaporation, les constituants salins du tampon n'atteignent jamais en aucun point du papier une concentration gênante pour l'expérience en cours.

2°. La bande de papier ne doit pas être trop longue, ni le courant électrique trop intense, sinon on pourrait observer une diminution trop considérable de la teneur du papier en eau dans sa partie centrale.

3°. L'évaporation doit être régularisée. Un moyen simple consiste à coiffer le papier par un large cylindre en matière plastique perforé de petits trous. (Voir fig. 1 le schéma du cylindre perforé à fond d'amiante V.) Ainsi sont évités les courants d'air qui accélèreraient l'évaporation plus en certains points qu'en d'autres.

D'autre part, nous obturons le haut du cylindre par un disque de carton d'amiante qui se comportera comme du buvard vis à vis des gouttes d'eau qui se condenseront à sa surface. Ces gouttes ne pourront donc pas retomber sur le papier et troubler le cheminement des substances étudiées.

Enfin, on retire très souvent avantage d'un refroidissement convenable des parois du cylindre car ceci active la distillation de l'eau depuis le papier jusqu'aux parois du cylindre. On peut, par exemple, refroidir en disposant sur le couvercle en amiante un cristal-

lisoir plein de glace pilée.

Nous avons parfois opéré dans une glacière; le courant liquide dû à l'évaporation est alors très intense et le parcours final de chaque fraction protéique est par conséquent raccourci, mais les électrogrammes sont très beaux et très réguliers.

En résumé, l'électrophorèse sur papier avec évaporation régularisée de l'eau que nous nommons *électrorhéophorèse* est, dans de nombreux cas, plus avantageuse que l'électrophorèse sans évaporation. En effet, l'évaporation produit dans le papier un courant liquide dont le débit varie régulièrement tout au long du papier. Ainsi les protéines se déplacent sous l'influence du champ électrique au sein d'un contre-courant liquide de plus en plus intense au fur et à mesure de leur cheminement. Chaque protéine s'arrête donc au point où la vitesse du flux liquide est exactement opposée à la vitesse de son déplacement par électrophorèse.

La position finale pour chaque protéine est indépendante de son point de départ et chaque protéine peut se déplacer dans le papier dans un sens ou dans l'autre suivant que son point de départ est situé au-delà ou en deçà de son point d'arrivée. Ainsi on peut faire se rencontrer en cheminant en sens inverse dans le papier deux protéines quelconques, même si elles ont des charges électriques de même signe. Ceci est applicable à l'étude des réactions entre protéines et en particulier à l'immunologie (réactions antigène-anticorps): il suffit de choisir convenablement les points de départ.

Le fait que chaque protéine stationne en un point caractéristique du papier, en équilibre avec un flux liquide permet à l'électrorhéophorèse de déceler certaines hétérogénéités de protéines que l'électrophorèse ordinaire, même dans un appareil de *Tiselius* ne permet pas de déceler (hétérogénéités de formes des particules protéiques).

Les ions plus petits que les protéines peuvent être étudiés par électrorhéophorèse car le contre-courant évite que leurs spots s'estompent trop rapidement par diffusion et les maintient dans les limites du papier pendant des expériences d'assez longue durée. Ceci permet des applications microanalytiques variées.

Les molécules non ionisables se déplacent au sein du papier sous l'influence du flux liquide et elles vont se rassembler sur une ligne dite „ligne de flux nul” où ne reste aucun ion.

Je tiens, à remercier les collaborateurs qui ont apporté leur aide précieuse pour la réalisation de ce travail: *Pierre Rebeyrotte, Madeleine Brunerie et J. M. Dubert.*

1) *Barbu, E., Macheboeuf, M., Rebeyrotte, P. et Slizewicz, P.*, Bull. soc. chim. biol. 34, 724 (1952).

2) *Cremer, H. et Tiselius, A.*, Biochem. Z. 320, 273 (1950).

3) *Durrum, L.*, J. Am. Chem. Soc. 72, 2943 (1950) et J. Colloid Science 6, 274 (1951).

4) *Ganzin, M. et Macheboeuf, M.*, Bull. soc. chim. biol. 34, 32 (1951).

5) *Kunkel, G. et Tiselius, A.*, J. Gen. Physiol. 35, 89 (1951).

6) *Macheboeuf, M., Rebeyrotte, P. et Brunerie, M.*, Bull. soc. chim. biol. 34, 1543 (1951).

7) *Partridge, S.*, Nature 164, 443 (1949).

Critische beschouwing over de quantitative bepaling van de eiwitfracties bij papierelectrophorese

door G. A. J. van Os

543.865 : 537.363

Praeklinisch Instituut der R.K. Universiteit
Kapittelweg 40, Nijmegen.

Een overzicht wordt gegeven van de verschillende methodes, die in gebruik zijn om, na electrophorese van eiwit op papier, daaruit quantitative gegevens over de verschillende fracties af te leiden. In het bijzonder wordt ingegaan op de fouten, die bij de directe fotometrische methode kunnen worden gemaakt, en middelen worden aangegeven om deze te vermijden.

Wanneer de electrophorese op het filtreerpapier is uitgevoerd en daarmee de scheiding van de eiwitfracties tot stand gebracht is, blijft nog het probleem, hieruit quantitative gegevens te verkrijgen.

Het meest direct is de methode, waarbij het papier in strookjes wordt geknipt en het stikstofgehalte van elk strookje op een der gebruikelijke manieren wordt bepaald. Deze methode, die zeer hoge eisen stelt aan de nauwkeurigheid en uiterst bewerkelijk is, willen we verder buiten bespreking laten. Ook de z.g. retentie-analyse van *Wieland* en *Wirth*¹⁾ willen we slechts kort vermelden.

Hierbij wordt het papier zo opgesteld, dat een der zijranden van de strook over de gehele lengte 2 à 3 mm in een koperhoudende vloeistof steekt. In eiwitvrij papier stijgt de vloeistof sneller op dan in eiwithoudend papier en na drogen en kleuren is dan direct een curve te zien.

Een veel meer voor de hand liggende weg is, de eiwitfracties met een geschikte kleurstof te kleuren en daarna op een of andere manier de geadsorbeerde hoeveelheid kleurstof te meten. Er zijn op het ogenblik 3 kleurstoffen in gebruik, nl. broomphenolblauw, amidoschwarz en azokarmijn. De beide eersten geven een blauwe kleur, de derde een rode kleur. Men droogt de papierstrook eerst bij 100° C en „ontwikkelt” hem daarna in een oplossing van een der kleurstoffen. Na afloop wordt de overtollige kleurstof weer uitgewassen. Bij broomphenolblauw en azokarmijn gelukt dit volledig en wordt het eiwitvrije papier weer geheel wit. Amidoschwarz kleurt zeer krachtig, maar is niet geheel uit het papier weg te wassen.

Uit de gekleurde vlekken op het papier moet nu de verhouding tussen de verschillende eiwitfracties worden afgeleid.

Turba en *Enekel*²⁾ doen dit, door het papier tussen de fracties door te knippen, uit de stukken de kleurstof te elueren, en de extinctie van de gebruikte vloeistof te meten. Een meer gedetailleerd resultaat is te verkrijgen, indien men uit de gekleurde vlekken een curve afleidt, die de intensiteit van de kleur als functie van de afstand weergeeft. Deze curve kan dan quantitatief worden geanalyseerd. Tot heden zijn hiervoor twee manieren in gebruik en wel:

A. De indirecte fotometrische methode, o.a. toegepast door *Cremer* en *Tiselius*³⁾, *Kunkel* en *Tiselius*⁴⁾ en *Flynn* en *Demayo*⁵⁾, die allen broomphenolblauw als kleurstof gebruiken. Het papier wordt in een groot aantal even brede strookjes van bijv. ½ cm breedte geknipt. Uit elk strookje wordt de kleurstof weer geëluëerd en de extinctie van de elutie-vloeistof gemeten. Deze extincties, op afstanden

van ½ cm uitgezet geven dan de gevraagde curve. Met behulp van zuivere albumine en γ -globuline stelden *Kunkel* en *Tiselius*⁴⁾ voor deze eiwitfracties een lineair verband tussen extinctie en concentratie vast. Bij gelijke concentratie, betrokken op het stikstofgehalte, bleek albumine ongeveer 1.3 maal zo sterk te kleuren als het γ -globuline. *Cremer* en *Tiselius*⁵⁾ hadden al eerder hiervoor de waarde 1.6 aangegeven, gevonden door vergelijking met vrije electrophorese.

De indirecte methode heeft het voordeel dat hij met eenvoudige hulpmiddelen kan worden uitgevoerd. Een nadeel is de bewerkelijkheid. Bij een looplengte van 15 cm en strookjes van ½ cm breedte, moet men 30 strookjes elueren, dus 30 maal pipetteren en 30 metingen met de fotometer verrichten. Een ander nadeel is, dat men, om meetbare extincties te verkrijgen, de strookjes moeilijk smaller dan ½ cm kan nemen, waardoor men over een vrij groot gebied middelt, zodat fijnere details verloren kunnen gaan.

B. De directe fotometrische methode. *Grassmann* en medewerkers^{6) 7)} hebben deze methode het eerst toegepast. De met amidoschwarz gekleurde strook wordt eerst gedrenkt in een mengsel van paraffineolie en α -broomnaphthaline met dezelfde brekingsindex als cellulose, zodat het papier doorzichtig wordt, en vervolgens, geklemd tussen twee glasplaten, langs een 1 mm brede, door evenwijdig licht verlichte, spleet gevoerd. Telkens na 1 mm verplaatsing wordt de extinctie met behulp van fotocel en galvanometer gemeten. Deze extincties op afstanden van 1 mm uitgezet geven de gevraagde curve.

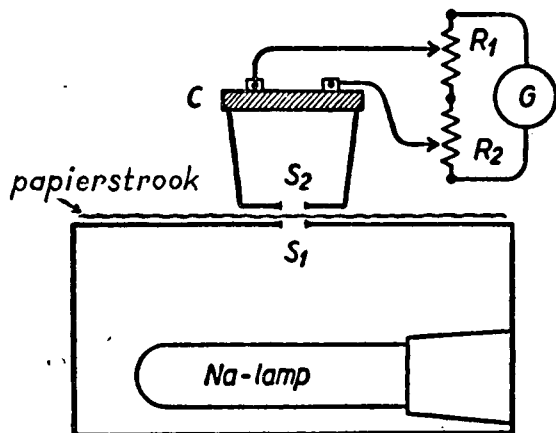


Fig. 1. Papierfotometer, schematisch.

S₁ en S₂: 1 mm brede spleten.
C: seleniumcel.
G: spiegelgalvanometer.
R₁ en R₂: gevoeligheidsregelaars, grof en fijn.
R₁ + R₂: critische dempingsweerstand van G.
De strook wordt door middel van een schroef met een spoed van 1 mm langs de spleten bewogen.

Persoonlijk gebruiken wij een papierfotometer volgens fig. 1. Daar wij broomphenolblauw als kleurstof gebruiken, kon met voordeel een Na-lamp als lichtbron toegepast worden. Het licht hiervan is vrijwel zuiver monochromatisch en bovendien is de lichtstroom zeer weinig van de voedingsspanning afhankelijk, zodat aansluiting op het lichtnet zonder bezwaar mogelijk is. De papierstrook wordt droog gemeten en ligt direct, zonder glasplaten, tussen twee 1 mm brede spleten geklemd. Daardoor behoeft geen evenwijdig licht te worden gebruikt en kon dus het gebruik van lenzen vermeden worden. Het droog doormeten heeft twee voordelen. In de eerste plaats kan men zo nodig voor papieronregelmatigheden corrigeren, door de nog niet gebruikte strook door te meten en de verkregen curve af te trekken van die, welke na de electrophorese verkregen wordt (fig. 2). In de tweede plaats

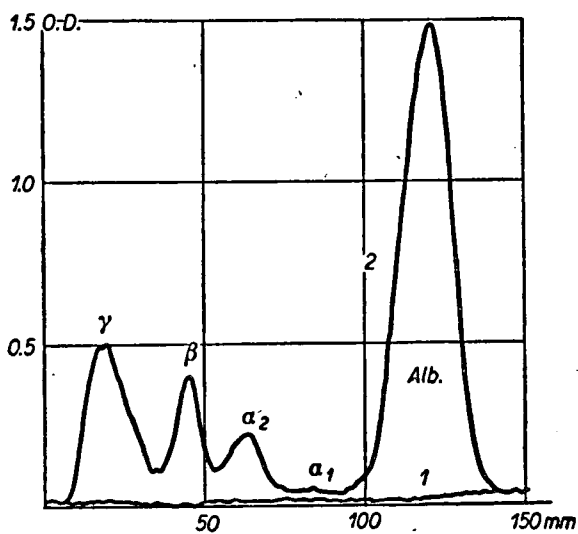


Fig. 2.

1. Curve verkregen met blank papier.
2. Curve na electrophorese.

Het verschil tussen 2 en 1 levert de gecorrigeerde curve.

heeft men het voordeel dat de strook bewaard kan worden, wat bij drenken in een olie-achtige vloeistof bezwaarlijk is.

Bij deze directe fotometrische methodes is het noodzakelijk dat het te onderzoeken materiaal in de vorm van een streep loodrecht op de lengterichting op het papier wordt gebracht en daarbij zo gelijkmatig mogelijk over deze streep wordt verdeeld. Brengt men het materiaal bijv. in de vorm van een ronde vlek op, of is de verdeling over de streep niet gelijkmatig, dan bestaat de kans op ernstige fouten. Het volgende voorbeeld moge dit aantonen. Stel we hebben op een papierstrook een albumine- en een globuline-band, beiden homogeen van concentratie, welke echter voor de albumine 2 maal zo groot is als voor de globuline. Meten we nu voor de albumine een extinctie 0.6, dan vinden we, aannemend dat beiden even sterk kleuren, voor de globuline dus 0.3, welke extincties corresponderen met transmissies van resp. $\frac{1}{4}$ en $\frac{1}{2}$. We denken ons nu dezelfde eiwithoeveelheden over de halve papierbreedte verdeeld, terwijl we toch doormeten met een spleet waarvan de lengte gelijk is aan de volle papierbreedte. Door de concentratie-verdubbeling wordt de transmissie van de albumine-band nu $\frac{1}{16}$ en, betrokken op de volle papierbreedte $\frac{1}{32}$. De niet gekleurde helft laat 50 %

van het invallende licht door, zodat de totale transmissie dus $\frac{17}{32}$ wordt. Voor de globuline band wordt op soortgelijke wijze $\frac{5}{8}$ gevonden. Deze transmissies corresponderen met extincties van 0.27 en 0.20. We zouden dus een albumine-globuline verhouding van 1.35 : 1 vinden in plaats van 2 : 1. Zou alleen de albumine over de halve papierbreedte verdeeld zijn, hetgeen bij opbrengen in de vorm van een ronde vlek wel wordt waargenomen, dan zouden we dus extincties vinden van 0.27 en 0.30, wat een albumine-globuline verhouding zou suggereren van 0.9 : 1!

De oorzaak van de gevonden afwijkingen ligt in wezen in het feit, dat er voor naast elkaar liggende absorberende lagen een additiviteitswet bestaat voor de transmissies, dus niet voor de extincties. Dit in tegenstelling met achter elkaar liggende absorberende

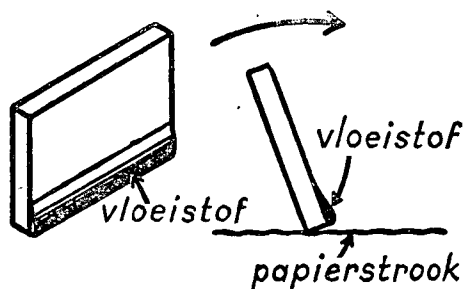


Fig. 3. Opbrengtechniek voor het verkrijgen van een gelijkmatige verdeling.

lagen, waarvoor de totale transmissie het product der transmissies is, zodat hier de extinctie wel de additieve eigenschap heeft.

De noodzakelijke gelijkmatige verdeling bereiken wij met behulp van een rechthoekig glasplaatje, waarvan de lengte wat kleiner is dan de papierbreedte (fig. 3). Het glasplaatje wordt vetvrij gemaakt en gedroogd, waarna uit een pipet 10 à 30 μ l

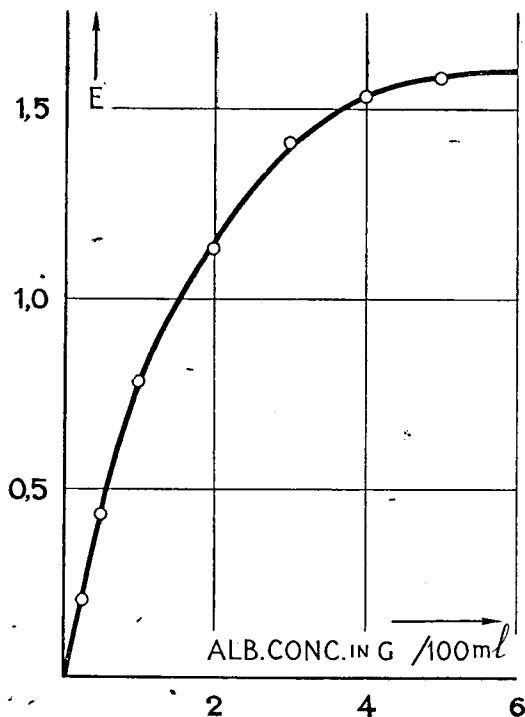


Fig. 4. Extinctie van papierstrookjes als functie van de albumineconcentratie. Kleuring: broomphenolblauw. Gemeten met Na-licht.

van het te onderzoeken serum aan een zijde langs de onderrand op het glas wordt gebracht. Nadat het plaatje op de in fig. 3 aangegeven wijze op het papier is geplaatst, wordt door kantelen in de richting van de pijl de vloeistof over de gehele breedte met het papier in contact gebracht.

De curve, die na het doormeten is verkregen, moet nu quantitatief geanalyseerd worden. De gebruikelijke methode hiervoor is het inpassen van gauss-krommen, waarvan de oppervlakken worden gemeten. Dit laatste kan gebeuren met een planimeter of door overtekenen op transparantpapier, uitknippen en wegen. Het gehalte der fracties in procenten van het totale eiwitgehalte kan dan worden berekend.

Daar bij dit intekenen een zekere willekeur niet te vermijden is, blijft er steeds een fout in de uitkomsten die bij de vrije electrophorese voor elke fractie $\pm 0.5\%$ van het totale eiwitgehalte kan bedragen. Hoewel men bij de papierelectrophorese uiteraard wel een wat grotere fout kan verwachten, vonden wij toch bij sommige duplo-bepalingen van eenzelfde serum dermate grote afwijkingen, dat een nader onderzoek gewenst leek. Deze afwijking trad niet op als het duplo-bepalingen betrof, waarbij gelijke hoeveelheden serum waren opgebracht, maar werd des te groter naarmate deze hoeveelheden meer verschillend waren geweest. Een voorbeeld hiervan geeft tabel I. Nader onderzoek bracht aan het licht, dat de gemeten extinctie niet evenredig is met de

Tabel I.

Albumine en γ -globulinegehalte in procenten van het totale eiwitgehalte. Voor kolom a is de opgebrachte hoeveelheid viermaal zo groot als voor kolom b.

	a	b
alb.	46.2	58.0
γ -glob.	25.1	22.2

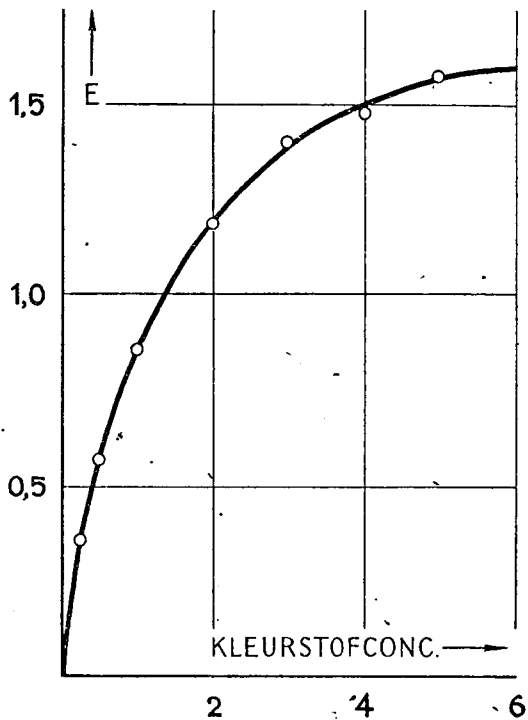


Fig. 5. Verband tussen extinctie en concentratie voor papierstrookjes, gekleurd in broomphenolblauwoplossingen. Meting met Na-licht.

eiwitconcentratie. Fig. 4 geeft het verband tussen extinctie en concentratie, dat wij vonden voor albumineoplossingen. Papierstrookjes werden gedrenkt in bufferoplossingen, die albumine in stijgende concentraties bevatten, daarna op de normale manier gekleurd met broomphenolblauw en vervolgens de extinctie gemeten tegen blank papier als blanco. Het bleek dat niet het eiwit de oorzaak van dit verschijnsel was, daar papierstrookjes die direct, dus zonder tussenkomst van eiwit, in broomphenolblauw-oplossingen waren gekleurd, nagenoeg hetzelfde verband te zien gaven (fig. 5). Vervolgens voerden wij deze proeven ook uit met amidoschwarz en azokarmijn (fig. 6), waarbij precies dezelfde afwijking gevonden

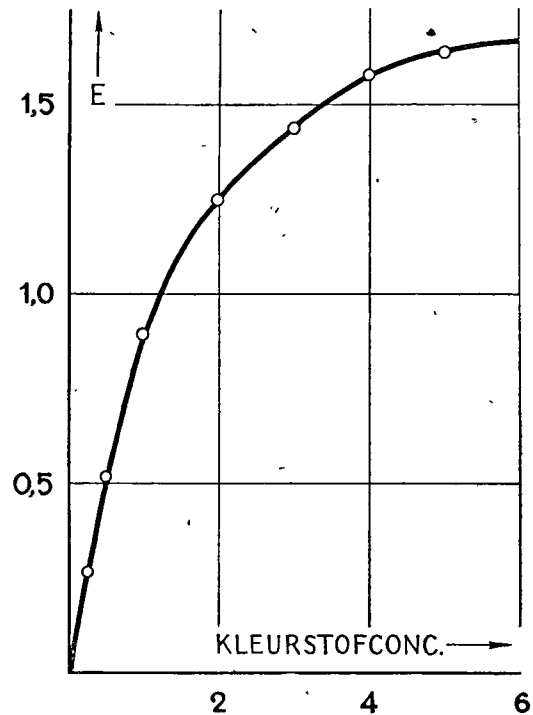


Fig. 6. Extinctie-concentratie verband voor papierstrookjes, gekleurd in azokarmijn-oplossingen. Meting met Unicam SP 500 bij $\lambda = 505 \text{ m}\mu$.

werd. Het doorzichtig maken van het papier door drenken in een geschikte vloeistof gaf geen verbetering. Oplossingen van genoemde kleurstoffen bleken echter de Wet van Beer wel exact te volgen. De conclusie ligt dus voor de hand, dat het papier zelf de oorzaak van deze afwijking is.

In welke richting wij de verklaring moeten zoeken, is in te zien aan de hand van wat we boven reeds betoogden. Wil nl. het gekleurde papier de Wet van Beer volgen, dan is een zeer gelijkmatige verdeling noodzakelijk. Een volkomen gelijkmatige verdeling is echter in papier principieel niet te verwezenlijken, daar papier nooit homogeen is. Delen van het papier met wijde poriën nemen meer vloeistof op dan die met nauwere poriën, en bevatten dus ook meer kleurstof. Een afwijking van de Wet van Beer is het gevolg. Fig. 7 geeft het verband weer tussen extinctie en concentratie, dat wij, met behulp van de additiviteitswet voor de relatieve transmissies, berekenden voor het bijzondere geval, dat 2% van de papierbreedte in het geheel geen vloeistof opneemt. We zien hier een soortgelijke afwijking als bij de metingen werd gevonden.

Daar de kromme, die wij met behulp van albumine vonden, voor ons papier (Whatman no. 1) goed

reproduceerbaar bleek te zijn, hebben wij deze gebruikt om electrophorese-curves, waarin extincties groter dan 0.8 optraden, te corrigeren. Tabel 2 geeft een voorbeeld van een serum met hoog en een met laag albuminegehalte. Kolom b geeft het gehalte der

fotometrische methode vaststelden, ook niet reëel is, maar berust op een verschil in elueerbaarheid. Daar echter een volkomen gelijk kleurend vermogen van de verschillende eiwitfracties voor geen der kleurstoffen a priori verwacht kan worden, zal nader onderzoek van dit probleem noodzakelijk zijn.

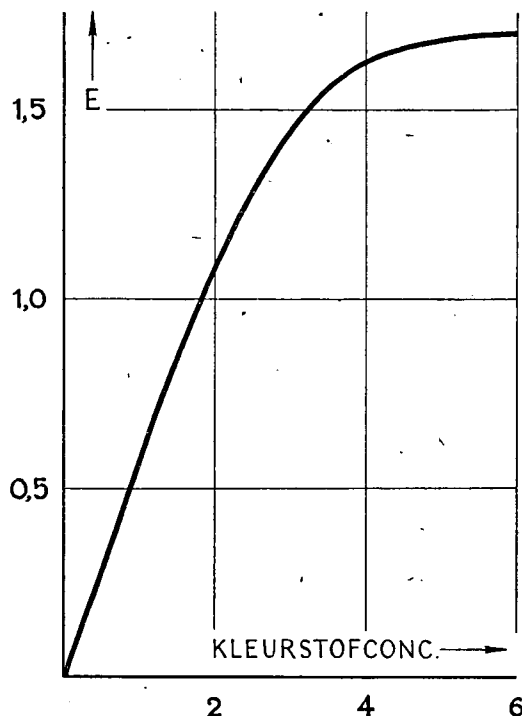


Fig. 7. Berekende extinctie-concentratie curve, voor het geval dat 2% van de papierbreedte geen kleurstof opneemt.

Tabel II.

Gehalte van de verschillende eiwitfracties voor twee sera, in procenten van het totale eiwitgehalte.

	Serum I			Serum II		
	a ₁	b	a ₂	a ₁	b	a ₂
alb.	46.2	58.0	57.5	35.0	29.9	31.6
α1	4.3	2.7	3.1	4.6	2.7	2.5
α2	11.3	7.5	7.9	11.1	7.1	7.6
β	13.1	9.7	10.5	11.2	8.7	8.5
γ	25.1	22.2	21.0	38.2	51.6	49.8

fracties in procenten, berekend uit een curve, waarvan de maximale extinctie 0.8 was. Kolom a, geeft het gehalte, als 4 maal zoveel serum werd opgebracht en de verkregen curve niet werd gecorrigeerd, terwijl kolom a₂ het resultaat geeft na correctie van deze curve. Door de correctie wordt nu de overeenstemming zeer bevredigend.

De praktische conclusie luidt dus dat men ofwel steeds een zodanige hoeveelheid serum moet opbrengen, dat de maximale extinctie niet boven 0.8 komt, ofwel men gaat tot 1.2 à 1.3 maar corrigeert dan. De correctiecurve kan natuurlijk in de schaal van de galvanometer verwerkt worden. Het voordeel van hogere extincties ligt in het feit, dat dan papieronregelmatigheden een relatief kleinere rol spelen.

Men kan zich tenslotte nog de vraag stellen, of de verschillende fracties ook een verschillend kleurend vermogen hebben. Volgens Grassmann⁶⁾ geldt dit zeker niet voor amidoschwarz, daar hij een volkomen overeenstemming vindt met de vrije electrophorese.

Op grond hiervan vermoedt Antweiler⁸⁾, dat het verschil in kleurend vermogen van albumine en γ-globuline, dat Kunkel en Tiselius bij de indirecte

Discussie:

Dr. M. J. Schulte vraagt wat het voordeel is van een curve; hij verdeelt de strook in vijf delen en bepaalt na extractie de kleurintensiteit. Verder merkt hij op, dat azokarmijn „Bayer” veel beter voldoet dan azokarmijn „Geigy”, het lost beter op en heeft ongeveer tweemaal sterker kleurend vermogen.

Antwoord: Het voordeel van een curve is, dat men meer details te zien krijgt. Verder komt het verdelen van de strook in stukken neer op het trekken van verticale lijnen door de minima van de curve. Het gebruik van de oppervlakken der aldus verkregen stukken, als maat voor het gehalte der fracties, is m.i. een minder goede benadering, dan die welke door het intekenen van gausskrommen wordt verkregen. Alleen bij gausskrommen van gelijke hoogte zou men hetzelfde resultaat vinden.

Dr. J. de Wael merkt op: Mij lijkt het gebruik van gausscurven niet verantwoord, zoals ik reeds in mijn voordracht heb uiteengezet.

Antwoord: De door Dr. de Wael bedoelde asymmetrie, die hij, in het bijzonder bij de albuminetop, in sterke mate vindt, werd door mij in vele gevallen in het geheel niet, in andere gevallen slechts in geringe mate waargenomen. Bij controle bleek mij, dat de gevonden curven de vorm van de ideale gausskromme dicht benaderen, zodat een analyse met behulp van zulke krommen m.i. alleszins verantwoord is.

Dr. E. B. M. de Jong zegt:

1. In aansluiting op de opmerking van Dr. de Wael moet ik opmerken, dat bij mij, gebruik makend van amidoschwarz, in 50% van de gevallen een zeer symmetrische curve verkregen werd, zodat dit toch zeker een praes is voor het intekenen van gausscurven en afwijkingen aan andere eiwitten toegeschreven moeten worden.

2. Bij Uw verklaring van de afwijkingen van de Wet van Beer, haalt U als bewijs aan, dat de oplossingen van de kleurstoffen wel de Wet van Beer volgen. Bij het papier is echter de concentratie van de kleurstof veel groter en voor geconcentreerde oplossingen geldt de Wet van Beer niet meer. Men zou dus geconcentreerde oplossingen moeten meten in cuvetten van bijv. 0.1 mm.

3. Wat betreft de correcties welke U aanbrengt, blijkt uit de tabel welke U geeft, dat procentueel bij de α-globulinen de grootste correctie wordt toegepast, terwijl daar juist de laagste correcties worden verwacht, daar de extincties hierbij juist het laagst zijn.

Antwoord: ad 2. Inderdaad werden de kleurstoffen gemeten bij 5 mm laagdikte, zodat een ongeveer vijftigvoudige verdunning noodzakelijk bleek om niet in onmeetbaar hoge extincties te vervallen. Het zou zeker de moeite waard zijn, deze meting bij zeer geringe laagdikte te herhalen.

(Dit is inmiddels gedaan bij laagdikten van 0.1 en 0.2 mm. De drie kleurstoffen bleven de Wet van Beer volgen. Gemeten werd met de Unicam S.P. 500 tot E = 2.)

ad 3. Door de toegepaste correctie zal inderdaad het oppervlak van een kleine fractie nauwelijks veranderen. Wanneer echter het totale oppervlak toeneemt, vooral door correctie van de hoge toppen, zal het oppervlak van een kleine fractie relatief moeten afnemen. Deze afneming kan in verhouding zelfs groter zijn, dan de toeneming van de grotere fracties.

Dr. W. Smeets merkt op: Naar aanleiding van het meningsverschil over het al of niet symmetrisch zijn van de curven van de verschillende fracties lijkt het mij noodzakelijk vooral ook de papiersoort in discussie te brengen. Gebruik makend van Whatman no. 1 en broomphenolblauw als kleurstof bleek bij een groot aantal curven de albuminetop nagenoeg symmetrisch te zijn. Tegen de methode om het papier in 5 stukken te knippen en hieruit de kleurstof te elueren, hebben wij het bezwaar, dat men van de onjuiste veronderstelling uitgaat, dat er slechts 5 fracties in het serum bestaan. Naar onze ervaring krijgt men het beste overzicht door de papierstrook, de curve en de cijfers, uit de analyse van de curve verkregen, bij elkaar te beschouwen.

De heer D. M. Brouwer merkt op, dat er meer kleurstoffen zijn, die met de naam amidoschwarz worden aangeduid, en dat met de door spreker genoemde kleurstof wordt bedoeld amidoschwarz 10 B.

Dr. L. A. Sluyterman zegt: Spreker neemt aan, dat de Nalamp monochromatisch is. Dit is echter alleen juist voor het

zichtbare licht. Er wordt echter ook een hoeveelheid infrarood uitgestraald. De geconstateerde afwijkingen van de Wet van Beer zijn m.i. hiermede volkomen te verklaren.

Verder maak ik er op attent, dat het impregneermiddel, bijv. dimethylphthalaat, gemakkelijk na afloop uit te wassen is met benzeen, zonder kleurstof te verliezen.

Antwoord: In de eerste plaats is de gevoeligheid van een seleniumcel in het infra-rode gebied reeds sterk afgenomen. In de tweede plaats kon zoals vanzelf spreekt de curve voor azokarmijn niet met de Na-lamp worden gemeten. Daarvoor werd dan ook gebruik gemaakt van de Unicam S.P. 500 spectrofotometer, die van een monochromator is voorzien. Omdat hierbij dus de infra-rode stralen ontbraken en toch dezelfde afwijking werd gevonden, kan m.i. de verklaring niet in deze richting gezocht worden.

Dr. J. de Wael vraagt: Is wellicht strooilicht mede de oorzaak van de niet-lineariteit van de extinctie-concentratie curve?

Antwoord: Een verandering in de strooiingstoestand van het door de cel ontvangen licht, kan men aanbrengen door de afmetingen van de seleniumcel te veranderen. Bij een verkleining van het cel-oppervlak tot $\frac{1}{4}$ van het normale oppervlak, kan ik

evenwel geen enkele verandering in de gemeten curve vaststellen, zodat de afwijking van de lineariteit vermoedelijk niet op grond van strooiingseffecten te verklaren is.

De heer C. L. J. Vink merkt op: In verband met de toegepaste kleurtechniek wordt gewezen op het werk van Klotz c.s. Deze onderzoeker vond bij dialyseproeven met methyloranje en bovine serum-albumine, dat de adsorptie-wet van Langmuir quantitatief opging. Daaruit kon zelfs worden berekend, dat 1 molecuul albumine maximaal 23 moleculen methyloranje kan adsorberen. Voor azosulfathiazol bleek bovengenoemde adsorptiewet echter niet op te gaan. De kleurstoffen, die bij de papierelectrophorese worden gebruikt voldoen mogelijk ook niet aan de wet van Langmuir. Hierdoor zou te verklaren zijn, dat men bij hogere extinctie-constanten dan 0.8 geen lineariteit vindt tussen de extinctie-constante en de eiwitconcentratie.

Antwoord: Het is natuurlijk niet onmogelijk, dat zulke effecten een rol spelen. Dat ze echter, indien aanwezig, vermoedelijk klein zijn, volgt uit het feit, dat een vrijwel overeenkomstige afwijking gevonden werd, wanneer het papier zonder tussenkomst van eiwit, met de bedoelde kleurstoffen werd gekleurd. Zie bijv. de figuren 5 en 6.

¹⁾ Wieland, Th. en Wirth, L., Z. angew. Chem. 62, 473 (1950).

²⁾ Turba, F. en Enenkel, A. J., Naturwiss. 37, 93 (1950).

³⁾ Cremer, H. D. en Tiselius, A., Biochem. Z. 320, 273 (1950).

⁴⁾ Kunkel, H. G. en Tiselius, A., J. gen. Physiol. 35, 89 (1951).

⁵⁾ Flynn, F. V. en Demayo, P., Lancet 261; 235 (1951).

⁶⁾ Grassmann, W. en Hannig, K., Naturwiss. 37, 496 (1950).

⁷⁾ Grassmann, W., Hannig, K. en Knedel, M., Deut. med. Wochschr. 76, 333 (1951).

⁸⁾ Antweiler, H. J., Die quantitative Elektrophorese in der Medizin. Springer Verlag 1952, blz. 38.

Beschouwingen naar aanleiding van klinische ervaringen met papierelectrophorese

door C. L. Harders

537.363 : 543.865 : 616-074

Het is van klinisch belang na te gaan in hoeverre de gebruikelijke methodes van kleuring der eiwitten juiste waarden leveren bij de bepaling der fracties van het bloedserum. Het lijkt gewenst na te gaan of met andere middelen meer gegevens kunnen worden verkregen omtrent de samengesteldheid van deze fracties. Meting in het ultraviolet bij verschillende golflengten wordt als voorbeeld genoemd.

De bepaling der eiwitfracties in het klinisch laboratorium kan door de methode van de papierelectrophorese aanzienlijk worden vereenvoudigd. Hierdoor wordt een veel ruimere toepassing van deze bepaling mogelijk gemaakt, wat niet alleen van belang is voor het beoordelen van het verloop van een ziekte, maar in sommige gevallen ook bij het stellen van een diagnose.

Het beeld, dat na electrophorese wordt verkregen, levert niet alleen quantitative doch ook kwalitatieve gegevens. Als voorbeeld van dit laatste kan genoemd worden de gemiddelde loopafstand van sommige delen van de fractie der gammaglobulines. Deze vormen in het electrophoresebeeld soms een zeer smalle, in andere gevallen een diffuse band (fig. 1).

De toepassing van de methode verkeert nog te zeer in een beginstadium om de klinische waarde ervan ten volle te kunnen beoordelen. Zeker is echter dat deze waarde in de eerste plaats bepaald zal worden door de reproduceerbaarheid en de juistheid van de bereikte uitkomsten. Dit zijn tot op heden op dit terrein nog zeer uiteenlopende begrippen.

De gebruikelijke wijzen van het zichtbaar maken der eiwitbanden op het papier berust op kleuring, waarna de hoeveelheid kleurstof wordt bepaald door doormeten der stroken resp. door extractie der kleurstof. De vraag, in hoeverre de nauwkeurigheid van het doormeten kan worden verhoogd, kan door een fysisch onderzoek worden beantwoord. Tevens zal

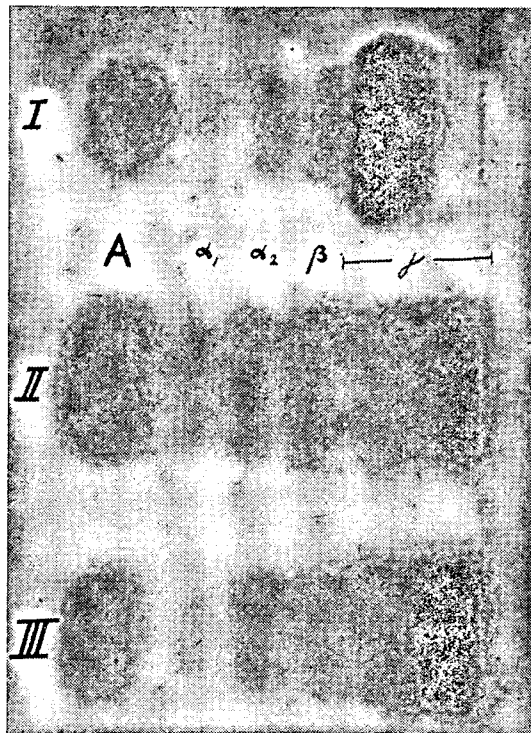


Fig. 1. Verschillende loopafstanden der gammaglobulines bij: I morbus Kahler, II hepatitis, III levercirrhose.

echter een onderzoek dienen te worden ingesteld naar de invloed van de omstandigheden, waarbij de kleuring geschiedt, op het kleurstofbindend vermogen der verschillende eiwitfracties en de daarin aanwezige eiwitten. Deze kleuring vindt soms plaats na denaturering der eiwitten door drogen van de door bufferoplossing vochtige stroken onder verwarming. Welke invloed hierbij de genoemde verschillende eiwitten ondergaan wat betreft hun affiniteit ten aanzien van de verschillende gebruikte kleurstoffen is niet bekend. Dit geldt ook voor en is ten minste van even groot belang ten aanzien van onder pathologische omstandigheden voorkomende eiwitten.

Zolang deze vragen niet beantwoord zijn ligt het voor de hand dat men klinisch deze kleurmethodes slechts zal mogen hanteren indien men zich aan een tot in de details gestandaardiseerd voorschrift houdt. Slechts dan zal men wellicht reproduceerbare zij het geen juiste resultaten mogen verwachten.

De verkregen cijfers voor de verschillende eiwitfracties zullen namelijk geen juist beeld geven van de werkelijke hoeveelheden der eiwitten die op de verschillende plaatsen in het papier aanwezig zijn. Ook met deze restrictie is de methode reeds thans zeer bruikbaar voor klinische doeleinden, omdat men, mits aan de eisen van reproduceerbaarheid is voldaan, vergelijkenderwijs de uitkomsten kan beoordelen.

Men vraagt zich bij het veelvuldig hanteren van deze methode af, of het mogelijk is het klinisch nut nog te verhogen door toepassing van technieken die een duidelijker differentiatie tussen de verschillende eiwitfracties met de papierelectrophorese mogelijk maken en zo mogelijk tevens een betere differentiatie tussen de eiwitten die in een en dezelfde fractie voorkomen, dan met de tot dusverre gebruikelijke kleurstofmethododes bereikbaar is.

Behalve aan het gebruik van andere kleurstoffen en reagentia op eiwitcomponenten denke men hier aan fysieke middelen.

Een poging in deze richting werd gedaan door middel van ultraviolet licht. Hiertoe werden de stroken, na de electrophorese en na drogen bij 100° C bevrijd van bufferbestanddelen, waarna zij achtereenvolgens met licht van 280 en 300 m μ werden doorgemeten. De metingen geschieden met behulp van de spectrophotometer van Beckman. Hiertoe werd het apparaatje gebruikt beschreven door Paladini en Leloir¹⁾. Dit bestaat uit twee spoeltjes en een telwerk passende in de cuvettenruimte van het instrument. Daarna werden de stroken op de gebruikelijke wijze met azocarmijn gekleurd en opnieuw doorgemeten met licht van 530 m μ (zie fig. 2).

De beelden die op deze wijze werden verkregen

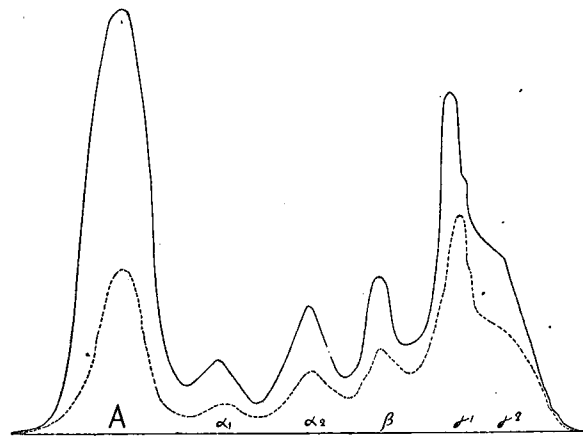


Fig. 2. ——— verband tussen plaats der eiwitten en extinctie bij doormeten van de gekleurde strook. - - - idem bij doormeten van de niet gekleurde strook met U.V. licht (verschil der extincties bij de metingen bij 280 en 300 m μ).

gelijken kwalitatief op elkaar. De quantitative afwijkingen kunnen het gevolg zijn van het verschil in gehalte aan aromatische aminozuren in de verschillende eiwitten.

Uit voortgezet onderzoek zal moeten blijken of aldus verschillen kunnen worden waargenomen tussen kleurstofbinding en U.V. absorptie die van essentieel belang zijn, met name t.a.v. eiwitten die onder pathologische omstandigheden vermeerderd zijn.

¹⁾ Paladini, A. C. en Leloir, L. F., Anal. Chem. 24, 1024 (1952).

Discussie:

De heer A. A. Pit merkt op dat men uit het door spr. getoonde eiwitbeeld bij longcarcinoom geen algemene conclusies mag trekken. Voorts rijst de vraag welke de normale waarden zijn voor de verschillende eiwitfracties.

Dr. Th. Strengers merkt op dat bij het stellen van de vraag naar de normale waarden, rekening moet worden gehouden met de reeds opgedane ervaringen bij de bepalingen van de eiwitfracties volgens Majoor en volgens Howe.

Zo vinden wij nu andere verhoudingen dan bijv. tijdens de oorlog of kort daarna. De tegenstellingen bij verschillende auteurs worden wellicht ten dele hierdoor verklaard.

Dr. Harders antwoordt dat het trekken van de grenzen van de normale waarden slechts kan geschieden op grond van zeer uitgebreid materiaal, waarbij behalve het klimaat en voeding ook rekening moet worden gehouden met de leeftijd. De klinische bruikbaarheid van de methode kan in de toekomst worden verhoogd indien vernauwing van de normale grenswaarden mogelijk blijkt.

Dr. M. J. Schulte merkt op dat door hem in een geval van onbehandelde pernicieuse anaemie het zo zeldzaam aan te treffen verschijnsel van een duidelijk verhoogd albuminegehalte tot 80% van het totaal eiwit in het serum werd waargenomen.

Papierelectrophorese van liquor cerebrospinalis

door H. J. Peters

537.363 : 611.82

Sint Canisius-ziekenhuis, Nijmegen.

De auteur beschrijft een eenvoudige methode voor het concentreren van liquor cerebrospinalis door middel van centrifugo-ultrafiltratie, ten behoeve van papierelectrophorese van liquores.

Voorwaarde voor het verkrijgen van een goed gedifferentieerd electrophorese diagram, is een vloeistof met een eiwitgehalte van 40 g per liter. Daar een normale liquor slechts 250—400 mg eiwit per liter bevat, moet deze dus 100—200 maal geconcentreerd worden.

Voor de klassieke electrophorese bestaat dit probleem ook, zij het in mindere mate. *Booy*¹⁾ kan hierbij volstaan met een viervoudige concentratie. Dit wordt bereikt door de liquor tot $\frac{1}{4}$ van zijn volume in te dampen in vacuo.

Deze methode is voor een 100-voudige concentratie ongeschikt omdat het keukenzout dan in het

maakt. Dit menen we bereikt te hebben door *centrifugo-ultrafiltratie*.

In kleine reageerbuisen worden collodiumzakjes gegoten (Collodium-oplossing 301—261 van The British Drug Houses). Deze worden in een precies crom passende, met veel gaatjes geperforeerde ebonieten huls geplaatst. Deze ebonieten huls is bovenaan voorzien van een wijdere rand, waardoor hij in een gewone 25 ml centrifuge buis blijft hangen. Daardoor is het dan mogelijk om de collodiumzakjes

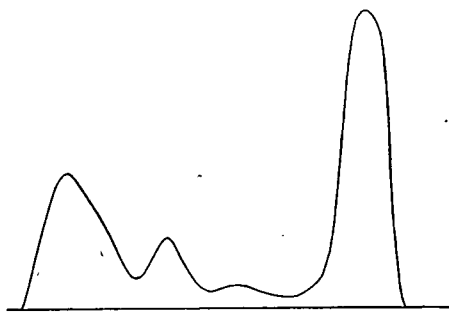


Fig. 1. Serum.

concentraat gaat uitkristalliseren daar het normale gehalte van de liquor aan NaCl 7 g per liter bedraagt.

*Bücher e.m.*²⁾ slaan het eiwit bij -5° C neer met aceton, om het vervolgens met 15000 toeren af te centrifugeren en het eiwit daarna op te lossen in een buffer. De gehele bewerking moet in een ruimte van -5° C worden uitgevoerd. Dit zijn nogal moeilijk te realiseren proefomstandigheden, reden waarom we aan de methode die gebruik maakt van semipermeabele membranen de voorkeur geven. Dit is voor liquor al toegepast door *Kabat*³⁾ in de vorm van dialyse onder druk; door *Ewerbeck*⁴⁾ door dialyse tegen kolloïdale oplossingen; door *Scheid*⁵⁾ door ultrafiltratie.

*Esser c.s.*⁶⁾ hebben een combinatie uitgewerkt van verdamping in vacuo en dialyse, waardoor zij de zoutconcentratie constant kunnen houden. Het grote nadeel voor de kliniek van al deze methodes is, dat er ten minste een dag mee gemoeid is, óf dat de apparatuur te duur is. Daarom hebben we naar een methode gezocht die zonder kostbare apparatuur in enkele uren een honderdvoudige concentratie mogelijk

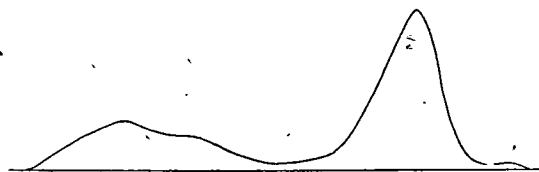


Fig. 3. Ventrikel liquor.

met liquor in de ebonieten huls in centrifugebuisen te centrifugeren.

Op deze wijze konden we in 4 uur een 20—60-malige concentratie verkrijgen, afhankelijk van de dikte der membranen.

Buitendien is het met de opbreng-methode van *van Os*⁷⁾ mogelijk om in plaats van 0,02 ml, zoals bij serum, 0,08 ml op te brengen, waardoor we nog een factor 4 winnen. De pathologische liquores hebben dikwijls een hoger eiwit-gehalte dan normaal, zodat we daar niet zo ver behoeven te concentreren.

Om na te gaan of bij deze centrifugo-ultrafiltratie niet een bepaalde eiwitfractie preferent aan het membraan wordt geadsorbeerd; hebben we sera 100 maal verdund met 0,9 % NaCl oplossing en deze op onze manier weer geconcentreerd. Daarna werden dan van de oorspronkelijke en geconcentreerde sera electrophorese diagrammen gemaakt en deze uitgemeten.

	Serum	Verdund en weer geconcentreerd serum
Alb.	51 %	55 %
α -Glob.	5 %	6 %
β -Glob.	11 %	9 %
γ -Glob.	33 %	30 %
Alb.	38,3 %	37,5 %
Tot. glob.	61,7 %	62,5 %
Alb.	58,2 %	57,8 %
Tot. glob.	31,8 %	32,2 %

We hebben verder nog getracht na te gaan of er eiwit in de membranen bleef zitten, door deze na de ultrafiltratie met gedestilleerd water te spoelen, op te lossen in alcohol-aethermengsel (1:2), dit in Kjeldahl-kolf te brengen en de alcohol en aether af te dampen en op de rest een stikstofbepaling volgens Kjeldahl uit te voeren. Daar we voor niet gebruikte membranen geen reproduceerbare uitkomsten hebben hebben we zakjes gemaakt van een stikstofvrij polytheen, om daar de proeven mee te herhalen. Het



Fig. 2. Verdund en weer geconcentreerd serum.

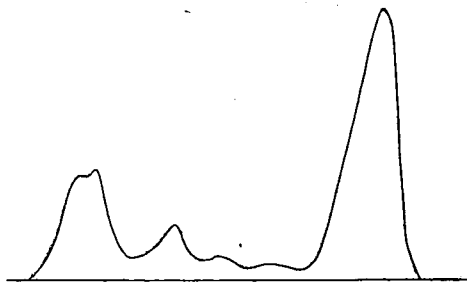


Fig. 4. Poliomyelitis liquor.

- ¹⁾ Booy, J., Psych. en Neur. Bladen 52, 247 (1949).
²⁾ Bücher, Th., e.m., Klin. Wochenschrift 30, 325 (1949).
³⁾ Kabat, E. A., e.m., J. Am. Med. 4, 653 (1948).
⁴⁾ Ewerbeck, H., Klin. Wochenschrift 31, 692 (1950).

bleek echter dat de polytheen membranen te bros waren en daardoor in de centrifuge stuk gingen.

We zullen deze moeilijkheden toch te boven moeten komen, want al is de overeenkomst van de sera en weer geconcentreerde sera bevredigend, er bestaat altijd de kans dat kleine hoeveelheden van speciaal in liquor voorkomende eiwitten (zie bijv. in fig. 3 het voor het albumine uitlopende eiwit) hierdoor aan onze aandacht zouden ontsnappen. Hierdoor wordt de kans om inzicht te verkrijgen in het mechanisme van goudsol en mastixsolcurven verkleind.

- ⁵⁾ Scheid, K. F. en Scheid, L., Arch. f. Psychiatrie 117, 219, 641 (1944).
⁶⁾ Esser, H., e.m., Klin. Wochenschrift 30, 228 (1952).
⁷⁾ Os, G. van, Biochim. et Biophys. Acta 9, 111 (1952).

Slotbeschouwing

J. C. M. Verschure

543.865 : 537.363

Van mij wordt verlangd, een uitzicht te geven op mogelijkheden die de bepaling van het eiwitspectrum biedt aan het ziekbed, in het bijzonder de verfijnde bepaling door middel van de papierelectrophorese. Door de ontwikkeling van deze laatste kan de klinische routine in de toekomst beschikken over veel gedetailleerder gegevens betreffende de serum-eiwitstoffen. Er ontstaan daardoor verscheidene vragen. In de eerste plaats kan men zich afvragen hoe het nu zal gaan met de talrijke serumvlokkingsreacties. In de tweede plaats doet zich de vraag voor in hoeverre de nauwkeurigere quantitative gegevens direct nut voor de kliniek kunnen afwerpen en welke ontwikkeling hier te verwachten is. Tenslotte zijn er reeds nu enkele geheel nieuwe mogelijkheden te voorzien die waarschijnlijk nog wel met tal van andere aangevuld zullen worden.

1. Papierelectrophorese en serumvlokkingsreacties.

Met allerlei ionen en met tal van kolloïden geeft bloedserum een uitvlokkingsreactie die in sera van verscheidene ziekten gemakkelijker en bij lagere concentratie van het reagens ontstaat dan in de sera van normalen. Aanvankelijk ontwikkelde zich een grote hoeveelheid empirische kennis omtrent het gedrag van sera met de verschillende vlokkingsreagentia. In het vorige decennium werden de vlokkingsreacties vooral op hun mechanisme onderzocht en hun samenhang met de verhoudingen in het eiwitspectrum nagegaan. Toen bleek dat een aantal der reacties afhankelijk was van de quantitative verdeling der onderscheiden eiwitfracties in het serum. Door bepaalde reacties gezamenlijk in een serum uit te voeren kon men vrij snel een indruk krijgen omtrent de eiwitverdeling, met name omtrent de verhouding albumine/gamma-globuline, de absolute hoeveelheid gamma-globuline, de alpha-globulinen etc. Een serie van vlokkingsreacties kon daarmee fungeren als een kortsluiting op de bewerkelijke eiwitspectrumbepaling.

Inmiddels bleek echter dat sommige reacties in belangrijke mate afhankelijk waren van kwalitatieve veranderingen van bepaalde fracties, bijv. de thymol-troebelingsproef. Hier wordt de troebeling vooral be-

paald door veranderingen van lipoiden welke aan de beta-globulinen gebonden zijn.

Zodra de papierelectrophorese technisch zover is vervolmaakt dat zij snel en betrouwbaar in het routinelaboratorium geschieden kan, vervalt een van de voornaamste argumenten voor het uitvoeren van een serie van vlokkingsreacties. Er is dan te weinig tijdwinst tussen het uitvoeren van zulk een benaderende proefreeks en het verkrijgen van veel gedetailleerder gegevens met de papierelectrophorese. Zonder twijfel zullen enkele vlokkingsreacties zich echter wel kunnen handhaven als selectieproeven, om uit een groot serum materiaal de afwijkende sera te halen.

De reacties, die berusten op het aantonen van kwalitatieve veranderingen in een of andere fractie, blijven naast de papierelectrophorese hun waarde onverminderd behouden.

2. Betekenis van het „eiwitspectrum” voor de kliniek.

Reeds met de bewerkelijke zoutscheiding en aansluitende stikstofbepaling der fracties werden veel nuttige gegevens voor de beoordeling van ziekten verkregen. Tot voor kort was deze fractionering als routinemethode nog slechts gebruikelijk in twee fracties, de ene hoofdzakelijk albumine, de andere hoofdzakelijk de globulinen. Deze grove scheiding en daarenboven de bewerkelijkheid van de methode gaven de eiwitspectrumbepaling een beperking. Het is dus niet verwonderlijk dat zij klinisch vooral gewaardeerd kon worden bij ziekten die met zeer sterke veranderingen in de eiwitverdeling gepaard gingen, zoals bijv. plasmocytomen, nephrose en levercirrhose. Anderzijds groeide de belangstelling voor de absolute hoeveelheden van bepaalde fracties. Met name was dat het geval voor de albumine-fractie.

De papierelectrophorese opent hier voor de klinische routine een nieuw gebied. De grove veranderingen in de eiwitverdeling kunnen door electrophorese aanzienlijk verder ontleed worden. Voor de plasmocytomen wordt een biochemische differentiatie mogelijk waarvan de klinische betekenis nog onvoldoende is uitgewerkt. Eerst nu kan men vaststellen

of men te doen heeft met een gamma- of met een beta-plasmacytoom. Er zou zelfs in hoogst zeldzame gevallen een alpha-plasmacytoom voorkomen. De *nephrose* en *levercirrhose* zijn in hun beloop, hun reactie op therapie etc. veel gemakkelijker te volgen indien men de eiwitverhoudingen op voldoende nauwkeurige wijze en geregeld kan controleren.

Maar ook voor de minder pregnante afwijkingen in de serum-eiwitverdeling ontstaan nu klinische mogelijkheden, die des te groter zijn naarmate de methode minder bewerkelijk is. De albumine-globulinenverhouding is immers bij *chronische infectieziekten* en bij *maligne tumoren* gestoord. De mate van stoornis is gebonden aan de aard van de ziekte en vaak ook aan de ernst. Wat de alpha-globulinen betreft zijn de onderzoeken van de laatste jaren zeer verhelderend geweest. De vondst dat zich onder de alpha-globulinen voornamelijk de stoffen bevinden die in verhoogde mate nodig zijn als specifieke afweerstoffen in beginstadia van *infectieziekten*, en in breder zin nog in omstandigheden van „stress” kan door de papierelectrophorese voor de klinische routine belangrijk worden. De studie van de beta-globulinen kan nieuwe aspecten mogelijk maken op de vetstofwisseling. Immers de beta-globulinen zijn de voornaamste dragers van de lipoiden. Hun stijging bij *stuwingsicterus* is in dit licht te zien. Ook de stijging in vroege stadia van *hepatitis* hangt vermoedelijk met de stuwingscomponent samen, die ongetwijfeld in het begin van een *hepatitis* pleegt voor te komen. Bij ziekten als *myxoedeem*, *diabetes*, *arteriosclerose*, *atheromatose* en tal van andere aandoeningen waarbij een stoornis in de vetstofwisseling gevonden is, of waarschijnlijk geacht wordt, is het verdere onderzoek van de beta-fractie aangewezen.

De top der gamma-globulinen geeft niet slechts aanleiding tot het berekenen van de hoeveelheid van deze fractie maar de aard van de top is vooral soms kenmerkend. Men neemt aan dat een hoge, spitse top met smalle basis wijst op de aanwezigheid van een homogeen eiwit, een plattere top met brede basis daarentegen op een groep van verwante eiwitstoffen die een *ongeveer* gelijke loopspinelheid hebben. De spitse hoge gamma-top bij het gamma-plasmacytoom wijst dan ook op de aanwezigheid van een bepaald gamma-globuline. Vooral door middel van de papierelectrophorese zijn zulke bijzondere eiwitstoffen als een vrij scherpe intensieve band, zij het ook in kleine hoeveelheid, gemakkelijk te isoleren en voor immunologische doeleinden of verdere chemische analyse te benutten. Ook toestanden, bekend als *macroglobulinaemie* van *Waldenström*, kunnen nu door middel van het routine-laboratorium herkend worden.

Wil dit alles tot zijn recht komen en aanleiding zijn tot verder vruchtbaar onderzoek dan is ook op dit gebied de nauwe samenwerking van medicus en klinisch-chemicus onontbeerlijk. Slechts deze samenwerking zal een grote aanvoer van klinisch wel-

gekozen materiaal opbrengen en tevens de beveiliging inhouden tegen onvoorzichtige interpretatie der resultaten, die immers nooit geheel op zichzelf mogelijk is, maar steeds moet geschieden binnen het kader van de complete gegevens welke omtrent het ziektegeval ter beschikking staan.

Een bewerking van zeer veel uitkomsten zal ons slechts verder kunnen inlichten over de uiteindelijke plaats die de papierelectrophorese zich in de klinische routine veroveren zal. Naar schatting hebben wij momenteel in Nederland reeds een materiaal van ca. 1000 patientensera beschikbaar. Ik meen dat het zeer vruchtbaar zou zijn indien allen die reeds materiaal verzameld hebben, dit gezamenlijk bewerkten en hoop dat dit symposium daartoe aanleiding mag geven.

3. Toekomstige ontwikkelingsmogelijkheid.

Hierover iets te zeggen wordt nog in hogere mate speculatief dan bij de voorgaande onderwerpen. De voordracht van Prof. *Macheboeuf* geeft daarover reeds stof genoeg. Indien ik mij echter beperk tot de papierelectrophorese zonder een grote verdampingsfactor, zoals te onzent gebruikelijk begint te worden, dan tekenen zich ook daar enige punten af die waard zijn in het kort nog even gereleveerd te worden. Een der voordelen van de papierelectrophorese boven de klassieke electrophorese volgens *Tiselius*, is, dat men in het eerste geval de alpha- en beta-fracties gemakkelijk zuiver in handen kan krijgen. Voor immunologische studies van de „middengroep” is dat van zeer grote betekenis. Het toepassen van een *vetkleuring*, bijv. met Soedan III, naast een zelfde diagram waarin de eiwitstoffen gekleurd zijn, maakt een studie van de verdeling der serumlipoiden onder verscheidene omstandigheden mogelijk. Het onderzoek naar de vandaag reeds vaker genoemde „*basiseiwitstoffen*” moet zeker ook ter hand worden genomen. De papierelectrophorese leent zich ook voor een vergelijkend onderzoek. Door het naast elkaar gelijktijdig laten lopen van serum dat op eenzelfde moment uit arterie en uit vene genomen is, wordt een betere studie van de *arterio-veneuse verschillen* tussen de serum-eiwitstoffen mogelijk. Ook het onderzoek van andere lichaamsvochten wordt gemakkelijker en de voordracht over de eiwitstoffen in de liquor cerebrosinalis is daarvan een uiting.

Ook gal, oedeemvloeistof, exsudaten, transudaten etc. verdienen geregeld onderzocht te worden opdat blijken zal, of hierin belangrijke diagnostische of andere gegevens schuilen.

De uiterst kleine hoeveelheid materiaal, die nodig is, zal het tenslotte mogelijk maken ook de weefsel-eiwitstoffen bij patienten in het onderzoek te betrekken, bijv. uit leucocyten, sternumpunctaten, leverpunctaten, proefexcisies etc. Kortom: een „*mer à boire*” ligt voor ons.

Allerlei nieuws

op chemisch en aanverwant gebied

Nieuwe adres Titaan N.V.

Van 31 Maart af zijn de kantoren van Titaan N.V. gevestigd in het Groothandelsgebouw Stationsplein 45, Rotterdam-C., tel. K 1800—29715.

Koninklijke/Shell-Laboratorium, Delft 25 jaar.

Ter gelegenheid van het 25-jarige jubileum van dit laboratorium hoopt de Directie hiervan vrienden en bekenden te ontvangen op Woensdag 8 April, tussen 4 en 6 uur, waarbij gelegenheid zal zijn tot bezichtiging van het jubileumgeschenk van het gezamenlijke personeel.

* * *

Proefschrift Dr. Ir. M. van den Tempel. Het proefschrift „Stability of oil-in-water emulsions”, waarop Ir. M. van den Tempel op 25 Maart te Delft werd bevorderd tot doctor in de technische wetenschap, gebaseerd op experimenteel werk in en ten behoeve van de Rubber-Stichting, zal binnenkort als Mededeling van de Rubber-Stichting verschijnen.

Personalia

Aan de Universiteit te Groningen is geslaagd voor het candidaatsexamen wis- en natuurkunde, letter f, de heer R. Dijkstra.

* * *

Aan de Universiteit te Leiden is geslaagd voor het doctoraal-examen wis- en natuurkunde, hoofdvak scheikunde, de heer Th. J. Boerstra; idem, zijn geslaagd voor het candidaatsexamen wis- en natuurkunde, letter f, de heren J. C. van Egmond, P. Levedag, M. Schlechter en J. L. Talen.

* * *

Ir. A. W. van Seters te Dordrecht is sinds 1 Maart directeur van het Keramisch Instituut T.N.O. te Gouda.

* * *

Aan de Universiteit te Utrecht zijn geslaagd voor het doctoraal-examen wis- en natuurkunde, hoofdvak pharmacie, de heren J. Struyvé en A. L. O. M. Smithuis (cum laude).

* * *

Aan de Universiteit te Utrecht zijn geslaagd voor het doctoraal-examen wis- en natuurkunde, hoofdvak scheikunde, de heren J. A. Kanters en J. A. Vliegthart; idem zijn geslaagd voor het candidaatsexamen wis- en natuurkunde, letter f, de heren J. B. de Goede en J. Lucassen.

* * *

Aan de Universiteit van Amsterdam is geslaagd voor het candidaatsexamen wis- en natuurkunde, letter l, de heer Lie Kiem Pwee.

* * *

Aan de Technische Hogeschool te Delft is bevorderd tot doctor in de technische wetenschap op proefschrift „Stability of oil-in-water emulsions”, Ir. M. van den Tempel, scheikundig ingenieur, geboren te Haarlem.

Verenigingonieuws

Mededelingen van het Secretariaat

(’s-Gravenhage, Lange Voorhout 5, tel. 110744, postrekening 7680).

Nieuwe leden.

De in het Chemisch Weekblad van Zaterdag 31 Januari 1953 onder 200 t/m 206 genoemde candidaat-leden zijn thans aangenomen als gewone of buitengewone leden van de Nederlandse Chemische Vereniging.

Candidaat-leden.

- 251: Bunk (Ir. A. J. H.), Venlo, Hertog Reinoudsingel 67, scheik. b.d. N.V. Pope’s Draad- en Lampenfabrieken; voorgesteld door Dr. J. Beuskens en Dr. B. W. Speekman, beiden te Venlo.
- 252: Erkelens (J.), tech. stud., Dordrecht, Frederikstraat 24; voorgesteld door Prof. Dr. W. G. Burgers en Dr. Ir. P. Dingemans, beiden te Delft.
- 253: Rozenbroek (Ir. H. Th.), Hoboken, N.J., U.S.A., c.o. Stevens Institute of technology, research-fellow; voorgesteld door M. D. Rozenbroek en Mej. Dra. M. J. van Royen, beiden te Hengelo.
- 254: Velde (P. C. van de), tech. stud., Delft, Hoornsestraat 31; voorgesteld door Ing. Techn. E. A. Leidelmeyer te ’s-Gravenhage en Ir. F. L. J. van Lamoen te Delft.

Adreswijzigingen, enz. aan te brengen in de ledenlijst 1952.

- Blz. 55: Giesberts (M. A. H.), chem. stud., Utrecht, Byronstraat 30.
- „ 69: Indemans (Dr. A. W. M.), ap., ’s-Hertogenbosch, Hertog Hendriksingel 92.
- „ 79: Krol (Ir. L. H.), Leiden, Hoge Rijndijk 270.
- „ 83: Lely (Ir. D.), Amsterdam-Z., Banstraat 50 huis.
- „ 99: Pinckaers (Ir. A. R.), Beek (L.), Heirstraat 47.

- Blz. 107: Schepen (J.), tech. stud., Schiedam, P. J. Troelstra-laan 9.
- „ 125: Vlieger (Ir. J. H. de), Delft, Spoorsingel 81.
- „ 136: Zwart (H.), chem. cand., Amsterdam-Z., Scheldestraat 129 II.

Chemische Kringen

Utrechtse Chemische Kring. Vergadering op Donderdag 16 April 1953 des avonds om 8 uur in „De Poort van Kleef”, Mariaplaats te Utrecht. Drs. A. H. Witte (’s-Gravenhage) zal spreken over: „Verlavingsgiften”. Introductie wordt gaarne toegestaan.

Mededelingen van verwante verenigingen

Bond voor Materialenkennis.

Kring Metalen.

Kringbijeekomsst op Vrijdag 24 April a.s. in Restaurant „Esplanade” te Utrecht.

10.00 u.: Dr. W. A. Baker, Manager of the British non ferrous research association.

Onderwerp: Non ferro metalen. Besproken zal worden het onderzoek op non-ferro gebied, zoals dit thans in Engeland geschiedt.

14.00 u.: (Voorlopig). De heer J. D. Fast (Philips, Eindhoven): Gassen in metalen.

Nederlands-Belgische Vereniging van Graan- onderzoekers.

Studiedag

gewijd aan de economische aspecten van onze graanvoorziening. Deze studiedag wordt gehouden op Woensdag 15 April te Utrecht in Restaurant „Vredenburg”, Vredenburg 13.

Programma:

- 11.00 h: Voordracht door de heer J. S. Brandsma, over *Enige aspecten van onze graanvoorziening in de nabije toekomst.*
- 12.30 h: Gemeenschappelijke koffietafel.
- 14.00 h.: Voordracht door Ir. J. F. van Riemsdijk, over *De economische betekenis van de inlandse graanbouw in het kader van de Nederlandse landbouw.*
- ca. 15.45 h: Sluiting.

Mededelingen van verschillende aard

Internationale Technische Hulp.

Vacatures in Ibadan (Nigeria) en Khartoum (Sudan).

1. Lector or assistant lecturer in Chemistry a/h University College te Ibadan (Nigeria).

Salaris: Lecturer £ 800—£ 1100. Verhogingen £ 50 p. j. Kindertoeslag £ 100 per kind (max. £ 300) voor kinderen, verblijvende in Nigeria.

Ass. Lecturer £ 600—£ 700. Verhogingen £ 50 p. j. Kindertoeslag £ 50 per kind (max. £ 150) voor kinderen verblijvende in Nigeria.

In beide gevallen: uitrustingsstoeelage £ 60. Reis vrij met gezin bij uitzending, einde van de verbintenis en jaarlijks verlof in Engeland. Gedeeltelijk gemeubileerde woongelegenheden tegen niet meer dan 7.7% van het salaris.

2. Senior lecturer in inorganic Chemistry a/h University College of Khartoum (Sudan).

Salaris: £E 1600—£E 1900. Verhogingen £E 75 p.j. Duurtoeslag £E 144. Uitrustingsstoeelage £E 50. Reis vrij met gezin bij uitzending, einde van de verbintenis en verlof. Momenteel geen inkomstenbelastingen in de Sudan.
LE = £ 1.0.6d.

Sollicitaties voor 1. in zesvoud, voor 2. in achtvoud met volledige inlichtingen en de namen van drie personen, bereid referenties te verstrekken, zijn via het Bureau voor Internationale Technische Hulp, Alexanderstraat 14, ’s-Gravenhage, voor 25 April a.s. te richten tot: Secretary Inter-University Council for Higher Education in the Colonies, 1 Gordon Square, London W.C. 1, waar nadere inlichtingen kunnen worden verkregen.

Nederlandse Organisatie voor Zuiver-Wetenschappelijk Onderzoek.

Z.W.O.-stipendia.

De Nederlandse Organisatie voor zuiver-wetenschappelijk onderzoek (Z.W.O.) zal, evenals het vorige jaar, voor het academisch jaar 1953—1954, enkele stipendia (fellowships) beschikbaar stellen om veelbelovende, jongere wetenschapsbeoefenaars de gelegenheid te geven zich op het terrein van hun keuze te ontwikkelen. Aan de verlening der stipendia zal een scherpe selectie vooraf gaan. Zij zijn bestemd voor Nederlanders, die met goed gevolg — en bij voorkeur nog niet lang geleden — een doctoraal- of ingenieursexamen hebben afgelegd of gepromoveerd zijn. Het doel is de wetenschapsbeoefening in Nederland te bevorderen; van de stipendiaten wordt dus verwacht, dat zij na afloop van het stipendium, althans gedurende enige jaren, in ons land werkzaam zullen blijven.

Betreffende de wijze van besteding van de stipendia bestaan geen andere beperkende bepalingen dan dat deze naar het oordeel van Z.W.O. dienstig is om het gestelde doel te bereiken. De stipendiaat kan in Nederland blijven of naar het buitenland gaan, op één plaats werken of rondreizen, een bepaald onderzoek verrichten, al dan niet met het oog op een academische promotie, colleges of cursussen gaan volgen, laboratoria, musea of bibliotheken bezoeken, enz. Hij moet echter van te voren een programma over leggen, waarvan, nadat het eenmaal (al dan niet gewijzigd) door Z.W.O. is goedgekeurd, niet kan worden afgeweken zonder toestemming van Z.W.O. of een door de organisatie aangewezen mentor. Het ligt in de bedoeling om, in die gevallen, die daarvoor in aanmerking komen, iemand aan te wijzen, een mentor, met wie de stipendiaat voortdurend contact houdt, die hem kan adviseren en die er op toe kan zien, dat het programma op de meest doeltreffende wijze ten uitvoer wordt gebracht.

Het stipendium bestaat uit twee bedragen: één voor levensonderhoud en één voor „onkosten”. Voor het eerste deel is de richtlijn een bedrag van f 5000.— per academisch jaar; wanneer het grootste deel van de periode in een zeer duur land wordt doorgebracht kan dit bedrag verhoogd worden ten einde het aan te passen aan de lokale levensstandaard; ook met bijzondere levensomstandigheden van de stipendiaat kan rekening worden gehouden. Uit het bedrag voor „onkosten” kunnen reiskosten, boeken, cursus-gelden, enz. betaald worden; dit bedrag wordt vastgesteld aan de hand van het goedgekeurde werkprogramma.

De stipendia worden in het algemeen verstrekt voor een academisch jaar, maar zij kunnen ook voor een periode van 6 maanden worden gegeven.

Candidaten kunnen zich in eerste instantie niet zelf aanmelden, doch slechts door bemiddeling van een tot oordelen bevoegd persoon (bijv. een hoogleeraar). Wanneer deze zich tot Z.W.O. wendt (Directeur J. H. Bannier, Lange Voorhout 60, 's-Gravenhage) geeft hij daarmee te kennen, dat de candidaat naar zijn mening iemand is van wie voor de Nederlandse wetenschapsbeoefening zeer goede verwachtingen gekoesterd mogen worden. Deze eerste aanmelding moet plaats hebben voor 15 April 1953. Na de eerste aanmelding ontvangt de candidaat aanwijzingen over de formaliteiten, die vervuld moeten worden, en de inlichtingen, die gegeven moeten worden voor het indienen van een definitieve aanvraag. Hij kan zelf namen opgeven van personen, die bereid zijn inlichtingen over hem (of haar) te verstrekken; aanbevelingsbrieven worden echter alleen geaccepteerd wanneer deze rechtstreeks, dus niet door bemiddeling van de candidaat, aan Z.W.O. worden gezonden. De selectie heeft plaats door het Bestuur van Z.W.O., dat de kandidaten uitnodigt voor zich of voor een daartoe ingestelde commissie te verschijnen.

Bezoek aan de Bazelse Jaarbeurs.

De Nederlandsche Bank heeft de Nederlandsch-Zwitsersche Kamer van Koophandel te Amsterdam (Keizersgracht 753 A, tel. 35135) gemachtigd verklaringen af te geven aan ingezetenen, die om zakelijke redenen de jaarbeurs te Basel willen bezoeken. Tegen overlegging dezer verklaringen, die tevens recht op een toegangsbewijs tot de beurs geven, kunnen de houders een bedrag van maximaal Zw.fr. 150.— per persoon bij de deviezenbanken aanschaffen. Inlichtingen over en faciliteiten voor een bezoek aan de Bazelse jaarbeurs, die van 11 tot 21 April a.s. wordt gehouden, worden door bovengenoemde Kamer verstrekt.

Aangeboden betrekkingen

Zie de advertenties in no. 13.

Grote Melkproductenfabriek zoekt voor haar laboratorium en bedrijf een scheikundige-bacterioloog (Dr., Drs. of Ir.).

De Brabantse Zuivelbond vraagt een landbouwkundig ingenieur, richting Zuivelbereiding, of een chemisch ingenieur of Drs. in de Chemie, bekend met bacteriologisch onderzoek, voor de functie van bacterioloog-scheikundige.

Vraag en Aanbod

Plaatsing geschiedt alleen voor leden der Nederl. Chem. Vereniging.

Correspondentie wordt over deze rubriek niet gevoerd: de Redactie, Lange Voorhout 5, 's-Gravenhage, zendt alleen brieven door, waarvoor men porto insluit.

Ter overneming gevraagd:

P. M. Heertjes, diss. Delft 1938.

R. Loosjes, pH-meting in suspensies, diss. Utrecht 1942.

De Ingenieur 1947 en 1948 (desnoods alleen de Afd. Weg- en Waterbouw).

Bosch, Viertalig woordenboek.

Optische bank van Zeiss profiel, liefst met enige ruiters.

Codex Medicamentorum Nederlandicus 1950.

Commentaar op de Codex Medic. Nederl. 1950.

A. Eucken und K. L. Wolf, Hand u. Jahrb. d. chem. Physik

Band 9, Abschnitt VI: K. W. F. Kohlrausch, Ramanspektren.

K. W. F. Kohlrausch, Der Smekal-Ramaneffekt.

K. W. F. Kohlrausch, Der Smekal-Ramaneffekt, Ergänzungsband.

Diss. Middendorp, Leiden 1917 en Diss. Teunissen, Leiden 1929.

Fette u. Seifen, 1939, nr. 6 (Juni); 1943, nr. 9 (Sept.); 1944, nr. 5 en 8 (Met en Aug.); 1945 t/m 1949.

Chem. Weekblad 15 en 16 (1918 en 1919).

J. Am. Chem. Soc. 66 (1944) nrs. 5, 7, 8 (Met, Juli, Aug.).

Oléagineux 1 (146) nr. 1; 2 (1947) nr. 1 en 2; 3 (1948) nr. 2 en 3.

Seifen-Oele-Fette-Wachse, 76 (1950) nr. 10.

Paint, Oil & Colour J. 117 (1950 nr. 2707; 121 (1952) nr. 2801.

Oil & Soap, jrg. 9 t/m 12 (1932 t/m 1945).

A. E. van Arkel, Moleculen en kristallen.

De opgaf van het aangeboden en gevraagde wordt tweemaal geplaatst. Wenst men daarna nog plaatsing, dan is daarvoor een nieuwe opgaf nodig. Men wordt dringend verzocht dadelijk kennis te geven, indien de plaatsing niet meer nodig is.

Gevraagde betrekkingen

868: Technoloog, Dr. in de scheikunde, met veel ervaring (ook tropen-) in voeding (bepaling vitamines, research), onderwijs, literatuurstudie, ook medisch gericht, wenst van betrekking te veranderen.

869: Chem. Drs. zou gaarne enige dagen of avonden per week productief maken, liefst in Limburg.

Agenda van vergaderingen

7—9 April: Vereniging Het Ned. Natuur- en Geneeskundig Congres (Leiden). 33e Congres. Zie het Chem. Weekblad pg. 210.

12—16 April: Congres over vitamines (Milaan). Zie voor het programma en adres voor informatie Chem. Weekblad pg. 226.

14 April: Haagse Chemische Kring ('s-Gravenhage): Dr. D. A. A. Mossel, Chemie en voeding. Zie Chem. Weekblad pg. 225.

15 April: Nederlands-Belgische Ver. van Graanonderzoekers, Ned. Afd. (Utrecht). Zie het programma in Chem. Weekblad pg.

16 April: Ned. Ver. van Bibliothecarissen, Sectie voor speciale bibliotheken ('s-Gravenhage). Algemene Vergadering. Zie het programma in Chem. Weekblad pg. 226.

16 April: Utrechtse Chemische Kring (Utrecht): Drs. A. H. Witte, Verslavingsgiften. Zie Chem. Weekblad pg. 251.

24 April: Bond voor Materialenkennis, Kring Metalen (Utrecht). Kringbijeenkomst. Zie het programma in Chem. Weekblad pg. 251.