

Z Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Janusz KLIMEK i Irena KRZECZKOWSKA

**Prosty sposób przystosowania mikropolarografu Heyrovsky'ego
do optycznej rejestracji elektroforogramów**

**Простой способ применения микрополярографа Heyrovsky'ого
для оптической регистрации электрофорограмм**

**A Simple Method of Adapting the Micropolarograph of Heyrovsky to
the Optical Registration of Electrophorograms**

Momentem przełomowym w rozwoju wiadomości o składzie białkowym surowicy krwi były badania Tiseliusa w latach (1937—1939) (11). Badania te, tak ważne i niezbędne, nie mogły być zastosowane na szeroką skalę, ponieważ używana aparatura była kosztowna. Dopiero prace Wielanda i Fischera (12) pozwoliły na zastąpienie kosztownej aparatury, używanej przez Tiseliusa, tanią i prostą w wykonaniu elektroforezą bibułową. Metoda ta zjednała sobie szybko wielu zwolenników, czego dowodem są liczne prace (1, 6, 10).

Bardzo ważnym elementem elektroforezy bibułowej jest ilościowa interpretacja uzyskiwanych elektroforogramów. W laboratoriach stosuje się w zasadzie dwa sposoby ilościowych oznaczeń. Pierwszy opiera się na wymywaniu barwnika zaadsorbowanego na białku przy pomocy odpowiednio dobranego rozpuszczalnika, a następnie na oznaczaniu intensywności barwy przy pomocy kolorymetru lub fotokolorymetru. Odczytane ekstynkcje służą następnie do wykreślenia krzywych. Powierzchnie pól odpowiadających poszczególnym frakcjom mierzy się planimetrem i na drodze przeliczeń oznacza się względny skład procentowy. Ten sposób, ilościowego oznaczania, wymaga dużo pracy i czasu, zwłaszcza w wypadku, gdy (w celu uzyskania większej dokładności) elektroforogramy tnie się na wąskie paseczki.

Drugim sposobem ilościowego oznaczania elektroforogramów jest bezpośrednia optyczna rejestracja. Polega ona na tym, że zabarwiony pasek elektroforogramu przesuwają się między fotoogniwem z jednej, a źródłem światła z drugiej strony. W ten sposób w fotoogniwie wzbudza się S.E.M. o zmiennym natężeniu. Po połączeniu końcówek fotoogniwa z galvanometrem można, według odczytów wychyleń wskazówki, narysować odpowiednią krzywą. Używając galvanometru lusterkowego, wykres otrzymuje się wprost na papierze światłoczułym.

Literatura podaje szereg adaptacji różnych przyrządów do optycznej rejestracji, a mianowicie przystosowanie mikrofotometru (8), polarografu i fotometru płomieniowego, polarografu i rzutnika do diapozytywów

(3, 5, 9). Celem naszej pracy było opracowanie jeszcze prostszego sposobu optycznej rejestracji, pozwalającego na szybkie ilościowe oznaczenie składu procentowego poszczególnych frakcji surowicy krwi. Cel osiągnięto przez zastosowanie aparatu własnego pomysłu, który połączono z mikropolarografem Heyrovsky'ego.

I. APARATURA I MATERIAŁY

Badania przeprowadzono z surowicą krwi 4 zdrowych osobników (po dwie próby). Elektroforeza trwała 18 godzin przy napięciu 120 V oraz natężeniu 2 mA. Do elektroforezy użyto aparatu skonstruowanego w Zakładzie Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Lublinie. Stosowano bufor weronalowy o pH 8,6. Elektroforogramy barwiono barwnikiem bromofenolowym (Biuro Zbytu Produktów Nieorganicznych w Gliwicach).

Do optycznej rejestracji użyto mikropolarografu Heyrovsky'ego typ M. 1026 N. P. Praha — Vršovice, łącząc go z aparatem własnego pomysłu (opis niżej).

Powierzchnię pól odpowiadających poszczególnym frakcjom mierzono planimetrem.

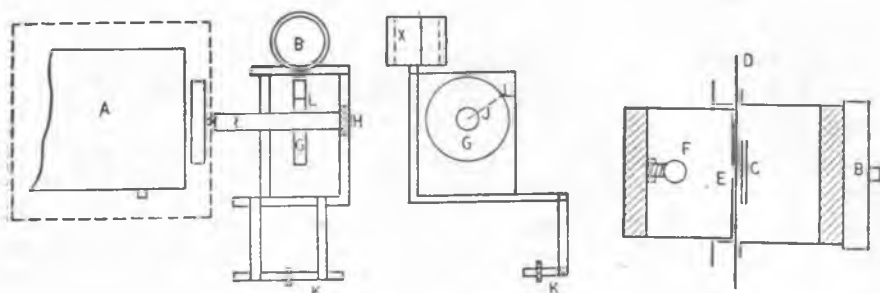
II. BADANIA WŁASNE

1. Opis metody własnej optycznej rejestracji składu procentowego surowicy krwi

Na ryc. 1 przedstawiono schematycznie aparat skonstruowany w Zakładzie Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie. Aparat był łączony z mikropolarografem Heyrovsky'ego (część oddzielona na rysunku linią przerywaną odnosi się do mikropolarografu).

Wysuszony pasek bibuły, na którym frakcje białkowe zostały uwidocznione przy pomocy błękitu bromofenolowego, umieszczano między szczeliną E i szybką szklaną C. Następnie nakładano tulejkę blaszaną z fotoogniwem B na walec ze źródłem światła F. Dolny koniec paska umieszczano w wycięciu bębna G i umocowywano małą blaszką L. Pasek ustawiano w ten sposób, aby przed szczeliną znalazła się nie zabarwiona część elektroforogramu. Po dokonaniu tych czynności nakręcano mechanizm zegarowy mikropolarografu i łączono oba przyrządy przy pomocy blaszki I, wsuwając ją w wycięcie śruby znajdującej się w uchwycie do nakręcania sprężyny. Aparat unieruchomiano przez przykręcanie do postumentu śrubę uchwytu K. Zapalano żarówkę (6 V i 1,8 W) zasilaną transformatorem włączonym do sieci poprzez stabilizator. Przez 10 minut „przyzwyczajano” fotoogniwo, które następnie łączono z galwanometrem lusterkowym mikropolarografu. W kasetę wkładano papier światłoczuły, reduktor nastawiano na 1/5 i zapalano żarówkę oświetlającą skalę oraz lusterko galwanometru. Puszczano w ruch mechanizm zegarowy, regulując szybkość tak, aby elektroforogram przesuwał się przed szczeliną

około 3 minuty. Wychylenia galwanometru były rejestrowane na papierze światłoczułym podobnie jak przy normalnym pomiarze polarograficznym.



Ryc. 1. Schemat aparatu do mechanicznego przesuwania elektroforogramów przed fotoogniwem.

Objaśnienia: A — mikropolarograf „Heyrovsky'ego”, B — fotoogniwo, C — szkiełko, D — bibuła, E — szczelina, F — źródło światła, G — bęben do przesuwania paska, H — łożysko kulkowe, I — blaszka sprzęgająca bęben z mechanizmem zegarowym mikropolarografu, K — urządzenie unieruchamiające przystawkę, L — zaczep paska, Ł — ośka.

Schematic presentation of the apparatus which mechanically moves electrophorograms in front of the photocell; A — micropolarograph of Heyrovsky, B — photocell. C — glass, D — filter paper, E — slit, F — source of light, G — drum which moves the strip, H — ball-bearing, I — plate which links the drum with the clockwork mechanism of the micropolarograph, K — contrivance for stopping the apparatus, L — belt hook, Ł — axle

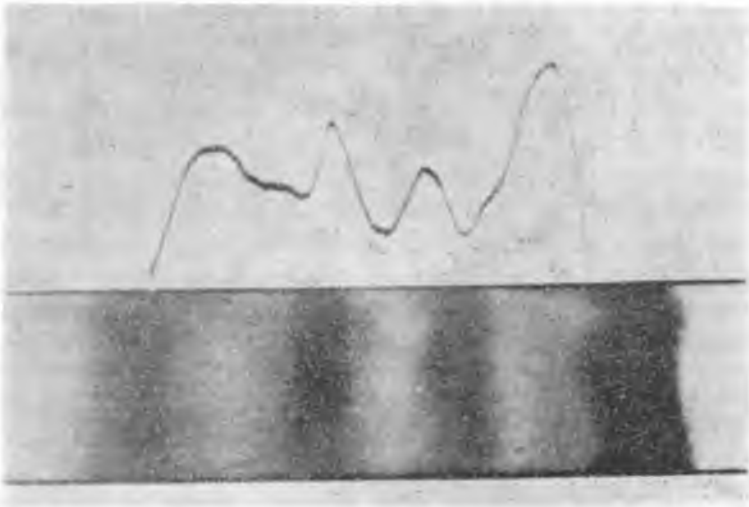


Ryc. 2. Fotografia aparatu własnego pomysłu dołączonego do polarografu Heyrovsky'ego.

Photograph of the original apparatus connected with the polarograph of Heyrovsky

2. Omówienie wyników

Na ryc. 3 widzimy elektroforogram surowicy krwi osobnika zdrowego oraz krzywą otrzymaną wyżej opisaną metodą.



Ryc. 3. Elektroforogram surowicy krwi osobnika zdrowego i odpowiadająca mu krzywa.
Electrophorogram of the blood serum of a healthy individual and corresponding curve

Ilościowe wyniki otrzymano wykreślając krzywe Gaussa, dzięki którym obliczono powierzchnie odpowiadające poszczególnym frakcjom. Względny skład procentowy odpowiednich frakcji otrzymano na drodze obliczeń. W tab. 1 zestawiono wyniki uzyskane w niniejszej pracy dla surowicy krwi osobników zdrowych z wynikami innych autorów.

Uzyskane wyniki, jak widać z zestawienia, w porównaniu z wynikami Blocka (1) oraz Ostrowskiego (8) posiadają rozbieżność w granicach \pm (od 0,3 do 3,1%). Według Ostrowskiego (8) odchylenia między wynikami różnych autorów odnośnie tego samego gatunku suro-

Tabela 1

Fracja	Wyniki podane w % według:			
	Grassman	Block	Ostrowski	Klimek
Albuminy	58,6 — 70,8	55,0	54	53,0
Globuliny α	6,22 — 7,4	7,2	13,2	9,9
Globuliny β	8,6 — 13,3	13,0	12,1	13,3
Globuliny γ	12,4 — 20,7	24,7	21,0	23,8

wicy mogą dochodzić do 15%. Grassman uzyskiwał wyniki wahające się w granicach: 12,2% dla albumin, 1,18% dla globulin α , 4,7% dla globulin β oraz 8,3% dla globulin γ .

Jak wiadomo na kształt krzywej ma pewien wpływ szerokość szczeliny. W oparciu o badania własne oraz o dane z piśmiennictwa ustalono, że najkorzystniejsze jest stosowanie szczeliny o wymiarach 3×30 mm.

Dużą zaletą opisywanej metody jest powtarzalność wyników. Zawsze ten sam elektroforogram daje identyczną krzywą. Nie bez znaczenia jest również fakt, że po dokonaniu pomiarów paski są zupełnie nienaruszone i mogą służyć do dalszych badań. Niektórzy autorzy np. Oppl t (9) uważają, że lepsze rezultaty osiąga się wówczas, gdy paski zabarwione błękitem bromofenolowym, wymoczy się w ciągu 5 minut w 5% wodnym roztworze kwasu cytrynowego, co powoduje zmianę barwy z szafirowej na żółtą. Przeprowadzone próby nie potwierdziły słuszności tego poglądu.

WNIOSKI

Opisana metoda jest szybka w wykonaniu i daje powtarzalne wyniki. Pozwala ona na wykorzystanie mikropolarografu do automatycznej rejestracji proteinogramów bibułowych.

Zastosowanie nowego aparatu, bezpośrednio połączonego z mikropolarografem, pozwala na usunięcie dodatkowych przyrządów i obniża koszty.

Opisana metoda może mieć zastosowanie praktyczne w każdym laboratorium posiadającym polarograf, aparat do mechanicznego przesuwania paska można łatwo wykonać we własnym zakresie.

P I Ś M I E N N I C T W O

1. Block R., Durrum E., Zwieg G.: A manual of paper chromatography and paper electrophoresis, New York 1955. s. 391—405.
2. Grassman W.: Die Elektrophorese von Proteinen. Naturwiss. 38, 200—206, 1951.
3. Kemula W., Bartosiewicz W.: Metoda elektroforetycznego rozdziału białek i automatycznego fotometrycznego oznaczania białek na bibule. Roczn. Chem. 28, 100—108, 1954.
4. Krause S., Piekarski L.: O elektroforetycznym rozdzielaniu i ilościowym oznaczaniu barwników. Acta Polon. Pharm. 16, 395—402, 1959.
5. Krawczyński J., Rycaj M.: Szybki sposób przystosowania fotometru płomieniowego Zeissa i polarografu Heyrovsky'ego do optycznej rejestracji proteinogramów bibułowych. Pol. Tyg. Lek. 9, 3—9, 1954.
6. Lederer M.: Introduction to paper electrophoresis and related methods. Amsterdam, 1955.
7. Ostrowski W., Mikucki A.: Fotoabsorbjometr samorejestrujący do elektroforezy bibułowej białek surowicy. Pol. Tyg. Lek. 7, 657—659, 1952.

8. Ostrowski W., Skarżyński B.: Uproszczona metoda elektroforezy w zastosowaniu do celów klinicznych. *Pol. Tyg. Lek.* 7, 120—124. 1952.
9. Oppl J., Kutáček M., Loštický C., Čížimský J.: Nová modifikace klinické mikro-analýzy bílkovin tělních. *Čas. Lek. Čes.* 92, 624—633. 1953.
10. Opieńska-Blauth J., Waksmundzki A., Kański M.: *Chromatografia*. Warszawa 1957, s. 267—315.
11. Tiselius A.: Die elektroforetischen Bestimmungen von Proteinen. *Kolloid-Z.* 85, 129—137, 1938.
12. Wieland Th., Fischer E.: Über Elektroforese auf Filterpapier. *Naturwiss.* 35, 29—30, 1948.

S U M M A R Y

The authors devised a simple method of adapting the micropolarograph of Heyrovsky to the optical registration of the separate protein fractions of blood serum. The micropolarograph was connected with an original apparatus which made the electrophorograms move in front of the photocell. Thanks to this combination it was possible to obtain graphs directly on photosensitive paper.

Р Е З Ю М Е

Авторами разработан простой способ применения микрополярографа Heyrovsky'ого для оптической регистрации отдельных белковых фракций сыворотки крови. Микрополярограф соединен с аппаратом, придуманным авторами, позволяющим перемещать механически электрофорограммы перед фотоэлементом. Благодаря связанию аппарата с микрополярографом можно было непосредственно получать изображение в виде чертежа на светочувствительной бумаге.

Рис. 1. Схематический рисунок аппарата для механического перемещения электрофорограмм перед фотофокусом; А — микрополярограф Heyrovsky'ого, В — фотофокус, С — стеклышко, D — бумага, E — щель, F — источник света, G — валик для передвижения бумажной полоски, H — шарикоподшипник, I — пластинка, соединяющая валик с часовым механизмом микрополярографа, K — механизм приостанавливающий приделку, L — зацепки бумажной полоски, Z — ось.

Рис. 2. Снимок аппарата конструкции авторов, соединенного с микрополярографом Heyrovsky'ого.

Рис. 3. Электрофорограмма сыворотки крови здорового человека и относящаяся к ней кривая.