

# Elektrophorese und Chromatographie von Eiweißkörpern und Polypeptiden

Von Prof. Dr. ARNE TISELIUS\*)

Biokemiska Institutionen, Uppsala/Schweden

Chromatographische und elektrophoretische Methoden werden heute nicht nur zur Trennung, Charakterisierung und präparativen Darstellung organischer und anorganischer Substanzen benutzt, sondern sind speziell aus der Biochemie und Medizin nicht mehr wegzudenken. Es wird eine Übersicht über einige in den letzten Jahren entwickelte Arbeitsweisen gegeben unter besonderer Berücksichtigung von Ergebnissen aus dem Arbeitskreis des Autors. Man darf erwarten, daß die obere Grenze der Teilchengröße der trennbaren Substanzen in den nächsten Jahren noch weiter zu makromolekularen Stoffen hinausgeschoben werden kann.

Das Thema dieser Abhandlung ist so umfassend, daß nur einige Beispiele der neueren Entwicklung und ihre Bedeutung für besonders aktuelle Probleme der Biochemie betrachtet werden können. Dabei sollen vor allem einige Arbeiten aus dem eigenen Laboratorium geschildert werden, um die Darstellung auf persönliche Erfahrungen stützen zu können.

In der Elektrophorese schickt man einen elektrischen Strom durch eine Lösung mit den zu trennenden Substanzen. Die erzielte Trennung beruht auf Unterschieden in der elektrophoretischen Beweglichkeit. In der Chromatographie läßt man die Lösung durch eine Säule aus fein gepulvertem Material fließen. Die Unterschiede in der Retention, verursacht durch verschiedene Affinität zum Säulenmaterial auf Grund von Adsorption, Ionenaustausch oder Verteilung, bewirken die Auf trennung.

Beide Methoden, besonders wohl die Chromatographie, haben eine außerordentlich weite Anwendung in der Chemie gefunden. In der Biochemie aber sind die Verwendungsmöglichkeiten besonders mannigfaltig. Die verschiedenen Methoden haben wesentliche Bedeutung erlangt, weil sie es — besonders wenn sie kombiniert werden — erlauben, eine Reihe von Problemen anzugreifen, bei denen andere Verfahren, wie es scheint, unzureichend sind.

Es handelt sich dabei einmal um die Isolierung und Reinigung von kompliziert gebauten Naturprodukten aus biologischem Material — ein Problem das gerade in der Biochemie ein Schlüsselproblem ist. Das Ausgangsmaterial enthält ja eine ungeheure Anzahl von Substanzen, einige von den interessantesten aber oft nur in winzigen Mengen. Manche der wichtigsten Bestandteile der lebenden Substanz sind auch sehr instabil und werden durch gewöhnliche chemische Reagentien angegriffen. Man ist deshalb gezwungen, möglichst schonende Methoden zu benutzen. Physikalische Methoden, wie Elektrophorese und Ultrazentrifugierung, bei denen die Trennung durch Transport in einem gleichmäßigen Medium gelingt, sind in dieser Hinsicht besonders vorteilhaft und haben sich besonders in der Protein-Chemie sehr gut bewährt. Wahrscheinlich aus technischen Gründen sind solche Verfahren aber bisher mehr analytisch als präparativ benutzt worden.

## Elektrophorese

Ein Beispiel einer elektrophoretischen Identifizierung, die eine gewisse Aktualität hat, zeigt Bild 1. Diese Diagramme wurden durch sog. „freie Elektrophorese“ in einem U-Rohr erhalten, wie die meisten Diagramme ähn-

licher Art, die man jetzt in der biochemischen Literatur findet. Eine moderne Ausführung eines solchen U-Rohrs

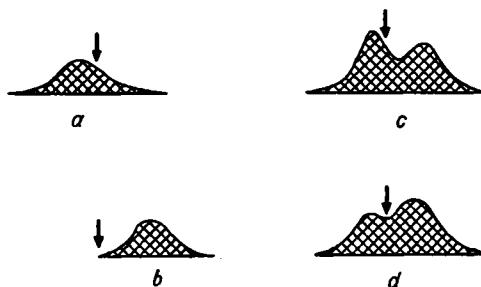


Bild 1  
Identifizierung von „Sickle Cell“-Hämoglobin (Sichelzellen-Hämoglobin) durch elektrophoretische Analyse (nach L. Pauling, Science [Washington] 110, 545 [1949]). a = normal, b = Sichelzellenanämie, c = Sichelzellen vorhanden, d = Mischung a + b zu gleichen Teilen

zeigen die Bilder 2 und 3. Die Substanz ist i. a. eine Lösung eines Eiweißgemisches, in diesem Falle ein Blutserum, das gegen eine Pufferlösung dialysiert wird. Die

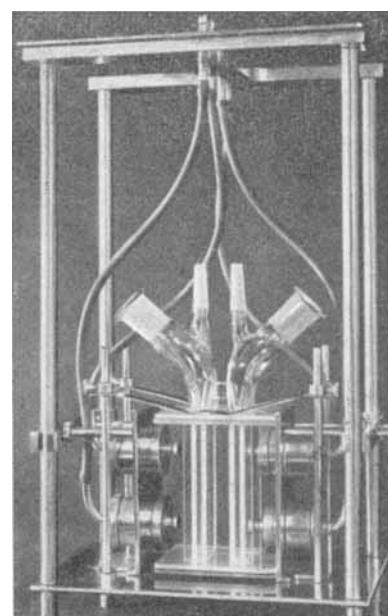


Bild 2  
Apparat zur elektrophoretischen Analyse

Lösung wird im U-Rohr unter eine Pufferlösung der gleichen Zusammensetzung geschichtet, so daß in jedem Schenkel eine Grenzfläche entsteht. Die Grenzflächen wan-

\*) Vorgetragen anlässlich der Verleihung der August-Wilhelm-von-Hofmann-Denkünze der GDCh in Heidelberg am 31. Januar 1955.

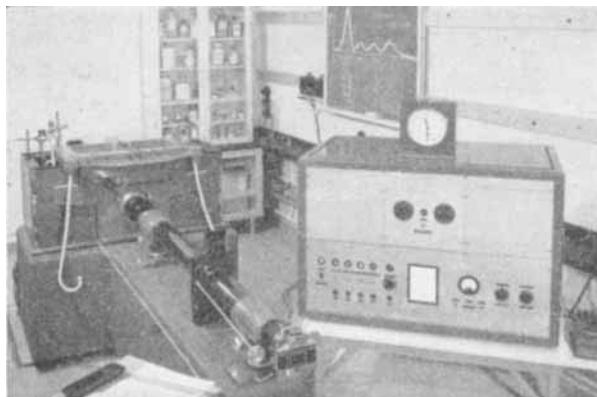


Bild 3  
Elektrophorese-Laboratorium im Biochemischen Institut, Uppsala

dern im elektrischen Felde und werden in mehrere Grenzflächen aufgeteilt, eine Folge der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der Lösungskomponenten. Die Grenzflächen können durch besondere optische Methoden beobachtet werden, womit Wanderungsgeschwindigkeit und auch relative Mengen einer Komponente bestimmbar sind (Bild 4). Es handelt sich also nicht nur um eine Trennung. Historisch ist die Methode vielmehr als ein Verfahren zur Messung von Beweglichkeiten der Eiweißkörper entstanden. Wenn also auch der Hauptzweck der Untersuchung eine Trennung ist, so ergibt doch darüber hinaus die Ermittlung der Wanderungsgeschwindigkeit eine Möglichkeit zur genauen Charakterisierung der Komponenten, wie es z. B. aus der elektrophoretischen Analyse von Blutsera bekannt ist.

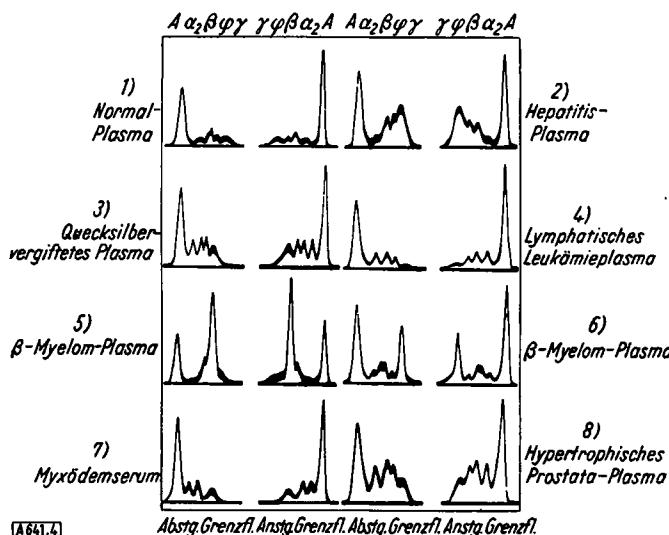


Bild 4  
Elektrophoretische Analyse von Blutplasma

Die freie Grenzflächenelektrophorese wird ständig weiter verbessert. Besonders wichtig sind wohl bessere optische Methoden, die Entwicklung von Mikromethoden und theoretische und praktische Arbeiten über die Grenzflächenanomalien. Allmählich werden auch Apparate für klinische Zwecke (Serumanalysen) industriell hergestellt, die besonders einfach zu handhaben sind und rasches Arbeiten gestatten.

#### Zonen-Elektrophorese

Anscheinend ist zur Zeit die interessanteste Entwicklung auf diesem Gebiet die „Zonen-Elektrophorese“ in ihren verschiedenen Formen, besonders, wenn es sich um

die Charakterisierung von Substanzen handelt. Der Verfasser hat vorgeschlagen, daß man zwischen Grenzflächen- und Zonen-Methoden bei denjenigen Methoden unterscheiden sollte, bei denen der Trennung Transportphänomene zu Grunde liegen. Dieser Unterschied wird durch Bild 5 verständlich. Man sieht, daß sowohl die soeben beschriebene Elektrophoresemethode als auch die gewöhnliche Ultrazentrifugierung Grenzflächenmethoden sind, während die gewöhnliche Chromatographie eine typische Zonenmethode ist. Die sog. chromatographische Frontanalyse

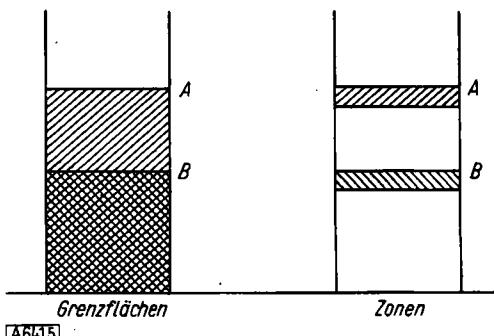


Bild 5  
Zur Definition der Grenzflächen - resp. Zonenmethoden

ist aber eine Grenzflächenmethode, und sowohl Elektrophorese als auch Ultrazentrifugierung lassen sich als Zonenmethoden entwickeln. Es ist ohne weiteres verständlich, daß die Zonen-Methoden prinzipiell überlegen sein sollten, weil sie eine vollständige Trennung herbeiführen. Leider kann man aber die Zonenmethoden nicht in freier Lösung verwenden, denn frei schwiegende Schichten sind wegen des Dichteunterschieds nicht stabil. Derartige Versuche können also nur bei Anwesenheit eines stabilisierenden Mediums ausgeführt werden, entweder durch Herstellung eines Dichtegradienten in der Lösungssäule, oder (gewöhnlich) durch ein geeignetes Füllmaterial. Unter diesen Methoden hat wohl die Filtrierpapier-elektrophorese die größte Verbreitung gefunden, besonders in der Protein- und Peptid-Chemie, bei Trennung von Zuckern (als geladene Borat-Komplexe) und bei Abbauprodukten der Nucleinsäuren (Bild 6). Es ist erstaunlich, wieviel man mit dieser einfachen Methode erreichen kann. Seit den ersten Versuchen, Filtrierpapier als Me-

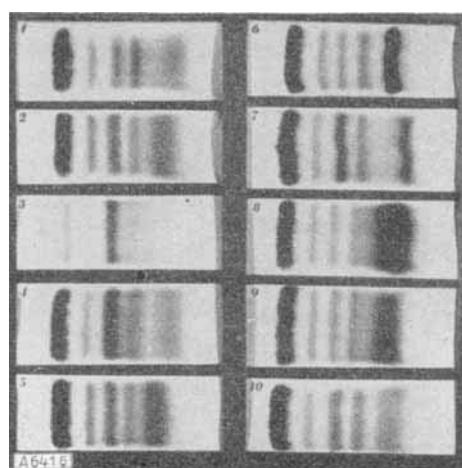


Bild 6  
Papierelektrophorese von Serumproben

1. Normalserum — 2. Paratyphus + Abrasio — 3. Nephros — 4. Diabetes + nephros (nierenkrank) — 5. Nephrite (Nierenstein) — 6. Myelom — 7. Myelom + Decubitus — 8. Cirrhosis — 9. Cirrhosis + Hepatitis — 10. Pankreas-Krebs

dium für Elektrophorese zu verwenden<sup>1-7</sup>) ist eine umfangreiche Literatur darüber entstanden. Unter den früheren Arbeiten über Elektrophorese in anderen stabilisierenden Medien sollen hier nur die Untersuchungen von Coolidge 1939 (Serumeiweiß in Glaswolle)<sup>8</sup>) von Consden, Gordon und Martin 1946 (Aminosäuren und Peptide in Kieselgel)<sup>9</sup>) und von Gordon, Keil und Sebesta 1949 (Proteine in Gelen)<sup>10</sup>) erwähnt werden.

Die großen Vorteile der verschiedenen Arten von Zonen-elektrophorese werden aber — wenigstens in den bisherigen Ausführungen — nur durch Aufgabe gewisser quantitativer Anforderungen gewonnen. Man muß bedenken, daß die stabilisierende Substanz in einem enormen Überschuß gegenüber sein muß, und daß jede Art von Wechselwirkung durch Adsorption oder ähnliche Einflüsse die Wanderung beeinflussen müssen und manchmal die Trennung oder wenigstens die quantitative Ausbeute beeinträchtigen. In dieser Hinsicht sollte man erwarten, daß die Gele vorteilhafter sein sollten, da manche Gele schon bei niedrigen Konzentrationen genügend stabil sind. Andererseits scheint eben bei Gelen eine quantitative Extraktion und Trennung der Substanzen (z. B. von Eiweißkörpern) von der Gelsubstanz schwierig zu sein. Eine ideale Füllsubstanz für die Zonenelektrophorese ist wohl noch nicht gefunden.

### Zonenelektrophorese-Apparatur in Uppsala

Unsere Apparatur für zonenelektrophoretische Versuche, die auch schon in manchen anderen Laboratorien verwendet wird, eignet sich besonders gut für vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Füllmaterialien (Bild

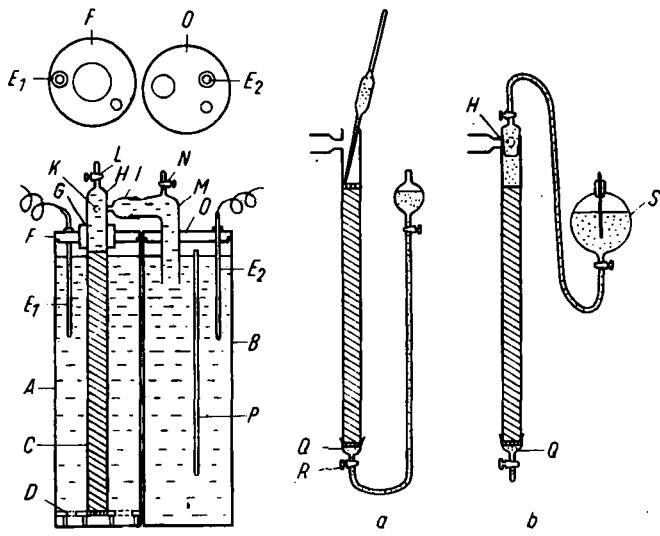


Bild 7

Apparat für Zonenelektrophorese in Säulen. Die getrennten Zonen werden beim Auslauf vom Säulenrohr b (rechts) in einem automatischen Fraktionssammler aufgefangen. (Nach J. Porath, Acta Chem. Scand. 8, 1813 [1954].)

A, B Glaszylinder, C Elektrophorese-Säule, D Schelbe aus Kunststoff, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> Elektroden, F, O Deckel, G, H, I, M Verbindungsrohren, K, R Hähne, L, N Hähne zum Auslassen von Luft, P Platte zum Auslassen von Luft, Q Adapter für die Elution der Fraktionen aus der Säule, S Mariotte-Flasche, zur Regulierung der Elutionsgeschwindigkeit

- <sup>1)</sup> D. v. Klobusitzky u. P. König, Arch. exptl. Pathol. Pharmakol. 192, 271 [1939].
- <sup>2)</sup> Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwiss. 35, 29 [1948].
- <sup>3)</sup> G. Biserte, Biochim. Biophys. Acta 4, 416 [1950].
- <sup>4)</sup> E. L. Durrum, J. Amer. chem. Soc. 72, 2943 [1950].
- <sup>5)</sup> W. Grassmann, K. Hannig u. M. Knebel, Dtsch. Med. Wschr. 76, 333 [1951].
- <sup>6)</sup> H. D. Cremer u. A. Tiselius, Biochem. Z. 320, 273 [1950].
- <sup>7)</sup> H. G. Kunkel u. A. Tiselius, J. Gen. Physiol. 35, 89 [1951].
- <sup>8)</sup> T. B. Coolidge, J. biol. Chemistry 127, 551 [1939].
- <sup>9)</sup> R. Consden, A. H. Gordon u. A. J. P. Martin, Biochemic. J. 40, 33 [1946].
- <sup>10)</sup> A. H. Gordon, B. Keil u. K. Sebesta, Nature [London] 164, 498 [1949].

7)<sup>11-12</sup>). Das vertikale Elektrophoreserohr mit Füllmaterial wird zwischen zwei Elektrodengefäßen eingeschaltet. Die Substanzmischung wird oben in die Säule eingeführt. Bei Stromdurchgang wandern die verschiedenen Substanzen abwärts und man bekommt eine Reihe von Zonen auf der Säule. Nach beendeter Trennung verdrängt man die Zonen mit Pufferlösung und die Fraktionen werden von einem automatischen Fraktionssammler aufgenommen. Dieses Verfahren hat den Vorteil daß dieselbe Säule wiederholt benutzt werden kann; dies ist in praxi wichtig, da die Herstellung einer gut gepackten Säule ziemlich mühsam ist. Die Bilder 8–10 zeigen einige Ergebnisse, die mit diesem (oder einem ähnlichen) Apparat gewonnen sind.

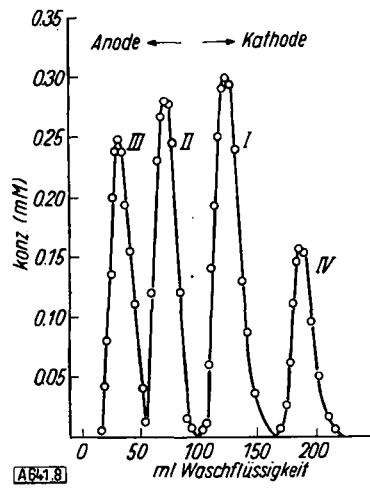


Bild 8

Trennung einer Mischung von Thiamin-Mono- (I), Di- (II) und Triphosphat (III) (Insgesamt 27 mg) und Thiamin (IV) (8 mg) durch Zonenelektrophorese in einer Cellulosesäule. Acetatpuffer  $p_H = 5,44$ ,  $\mu = 0,05$ , 30 mA in 15 Stunden. (N. Siliprandi u. D. Siliprandi, Biochim. Biophys. Acta 14, 52 [1954])

Als Säulenmaterial wurde Stärke oder Cellulose aus Baumwolle verwendet. Dieses Material scheint besser als Glaspulver oder pulverisiertes Filtrierpapier zu sein, das früher gebraucht wurde, eignet sich aber nicht für basische Proteine, die stark adsorbiert werden (z. B. Lysozym).

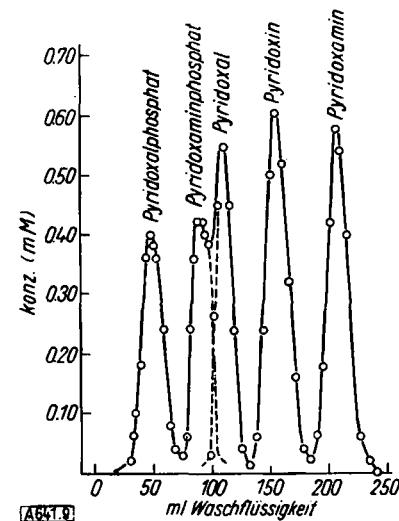


Bild 9

Trennung von Vitamin B<sub>6</sub>-Modifikationen (je 2,6 mg) durch Zonenelektrophorese in einer Stärkesäule. Acetatpuffer  $p_H = 5,1$ ,  $\mu = 0,05$ , 18 mA in 14 Stunden. (N. Siliprandi, D. Siliprandi u. H. Liss, Biochim. Biophys. Acta 14, 212 [1954])

- <sup>11)</sup> H. Haglund u. A. Tiselius, Acta Chem. Scand. 4, 957 [1950].
- <sup>12)</sup> P. Flodin u. J. Porath, Biochim. Biophys. Acta 13, 175 [1954].
- <sup>13)</sup> J. Porath, Acta Chem. Scand. 8, 1813 [1954].

Wie in allen zonenelektrophoretischen Versuchen hat man auf Grund von Elektroosmose einen Flüssigkeitstransport durch die Säule. Die Flüssigkeitsbewegung kann mit einer ungeladenen Bezugssubstanz, z. B. Dextran, verfolgt werden. Dadurch bekommt man einen Nullpunkt für

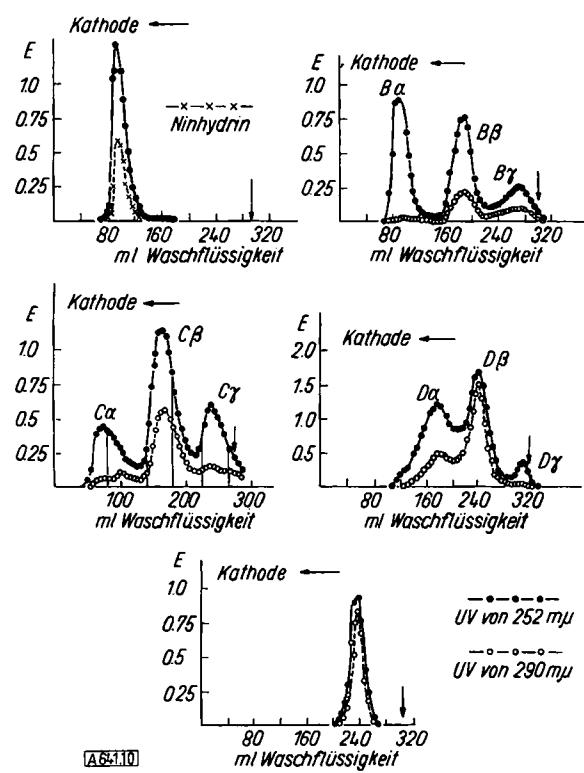


Bild 10

Trennung von fünf verschiedenen, chromatographisch isolierten Fraktionen von Bacitracin durch Zonenelektrophorese in einer Cellulose-Säule. Acetatpuffer  $p_H = 4,5$ ,  $\mu = 0,05$ , 25 mA in 55 Stunden. (J. Porath, Acta Chem. Scand. 8, 1813 [1954])

die Berechnung von absoluten Wanderungsgeschwindigkeiten aus den Diagrammen bei denen die Konzentrationsverteilung als Funktion des Verdrängungsvolumens (wie z. B. in den Bildern 8–10) aufgetragen ist. Tatsächlich erhält man dabei Beweglichkeiten, die mit den Messungen der freien Elektrophorese recht gut übereinstimmen (vgl. Tabelle 1; aus einer Arbeit von Flodin und Porath (1954)<sup>13</sup>).

Tabelle 1

Relative Beweglichkeit einiger Blutserum-Proteinfraktionen. Vergleich der Ergebnisse zwischen einer Stärke-Säule, Papier- und Grenzflächen-Elektrophorese. Beweglichkeit bei  $6,43$  und  $1,11 \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ volt}^{-1}$  (bei Grenzflächen-Elektrophorese), im Falle des Albumins und  $\gamma$ -Globulins.

Versuch	Globulin		
	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$
1.) Plasma .....	5,82	4,59	3,10
2.) Serum .....	5,87	4,64	3,03
3.) Serum .....	5,65	4,60	3,18
4.) Serum*) .....	—	4,52	3,28
<i>Kunkel-Tisellius (1951)</i>			
Mittelwerte .....	5,05	3,74	2,85
Grenzflächen-Elektrophorese	5,49	4,51	3,06

\*) Ungefähr 300 mg Protein in der Startzone von 6 ml.

Die Berechnung setzt eigentlich voraus, daß man das stromdurchflossene Flüssigkeitsvolumen in der Säule genau kennt. Diese Forderung wurde hier umgangen, indem man die aus der freien Elektrophorese bekannten Beweglichkeiten von Albumin und  $\gamma$ -Globulin als Bezugswerte benutzte.

Als Puffersubstanzen wurden in späteren Versuchen Pyridiniumsalze verwendet, die leicht durch Verdampfen zu entfernen sind. Bei Anwendung der Ultraviolettphotometrie sind sowohl bei der Elektrophorese als auch bei chromatographischen Versuchen die neuen von Porath vorgeschlagenen Puffersysteme aus Triäthylammoniumformiat, Acetat, Bicarbonat oder Carbonat vorteilhaft<sup>14</sup>). Zusammenfassend ergibt sich für Zonenelektrophoreseversuche: Glaspulver und pulverisiertes Filtrerpapier zeigen zu starke Adsorption und starke Elektroosmose (was störende Polarisationseffekte an den Säulenenden verursacht). Kartoffelstärke ist besser, besonders für Eiweißkörper, weniger gut für niedrigmolekulare Stoffe, die zu stark adsorbiert werden. Auch Stärke hat ja eine beträchtliche Ladung durch den Gehalt an Amylopektin. Wesentlich inerter ist ein Cellulose-Pulver, das durch eine spezielle Alkoholyse aus mit Natronlauge gewaschener Baumwolle hergestellt werden kann<sup>15</sup>). Bei der Alkoholyse werden auch die Carboxyl-Gruppen teilweise verestert. Tatsächlich zeigt dieses Material sehr niedrige Elektroosmose und sehr kleine Adsorption sowohl aus Protein-Lösungen als von niedrigmolekularen Stoffen. Diese Cellulose ist zweifellos das Beste, was wir bisher gefunden haben. Sie ist jedoch noch nicht ideal; vermutlich kann man in der Lösung dieses „Schlüsselproblems der Zonenelektrophorese“ noch wesentlich weiter kommen.

Auch für die Präparation von größeren Mengen ist der beschriebene Apparat sehr nützlich. Man kann, wie Flodin und Porath 1954 gezeigt haben<sup>12</sup>), auch sehr konzentrierte Eiweiß-Lösungen trennen, z. B. 10 proz. Serumalbumin. Eingehende physikalisch-chemische Studien in Uppsala von Pedersen und Kupke haben gezeigt, daß die durch Zonenelektrophorese erhaltenen Serumalbumine einheitlicher waren als die besten durch andere Methoden hergestellten Präparate.

Mit niedrigmolekularen Substanzen muß man aber bei viel niedrigeren Konzentrationen arbeiten, zumindest, wenn sie eine beträchtliche Eigenleitfähigkeit besitzen. Wir kennen eine analoge Schwierigkeit bei der Grenzflächen-Elektrophorese, wo derartige Substanzen oft sehr unsymmetrisch wandern und so die Versuche ganz verfälschen können. Diese sog. „Grenzflächenanomalien“ machen sich in der Zonenelektrophorese solcher Stoffe durch die Tendenz zur Ausbreitung der Zonen bemerkbar, der man nur durch die Wahl sehr niedriger Anfangskonzentrationen entgegenwirken kann. Eine andere, wenig beachtete, aber bei langer Versuchsdauer sehr wichtige Komplikation ist die „Polarisation“ an den Säulengrenzflächen, die starke Störungen des Potentialgefälles in der Säule verursacht und die wieder nur durch die Wahl eines geeigneten Füllmittels mit niedriger Eigenladung herabgesetzt werden kann. Solche Störungen sind ohne Zweifel auch in der Papier-Elektrophorese vorhanden und müssen bei jedem Versuch, die Ergebnisse für quantitative Beweglichkeitsbestimmungen auszuwerten, berücksichtigt werden.

#### Kontinuierliche Elektrophorese

Die kontinuierliche elektrophoretische Trennung von größeren Substanzmengen nach der Methode von Haugaard und Kroner<sup>16</sup>), Svensson und Brattsten<sup>17</sup>), Grassmann und Hannig<sup>18</sup>) beruht auf einer Kombination von vertikaler Flüssigkeitsströmung und horizontalem elektr.

<sup>14</sup>) J. Porath, Nature, im Druck.

<sup>15</sup>) P. Flodin u. D. W. Kupke, im Druck.

<sup>16</sup>) G. Haugaard u. T. D. Kroner, J. Amer. chem. Soc. 70, 2135 [1948].

<sup>17</sup>) H. Svensson u. I. Brattsten, Arkiv Kemi 7, 401 [1949].

<sup>18</sup>) W. Grassmann u. K. Hannig, diese Ztschr. 62, 170 [1950].

schem Transport, wie es Bild 11 andeutet. Die Methode kann grundsätzlich größere Substanzmengen auftrennen, erfordert aber zur vollen Ausnutzung sehr konstante Versuchsbedingungen, die eine ziemlich komplizierte Apparatur voraussetzen. Brattsten<sup>19)</sup> hat während der letzten Jahre einen Apparat gebaut, bei dem die Flüssigkeitsströmung durch ein peristaltisches Pumpensystem geregelt

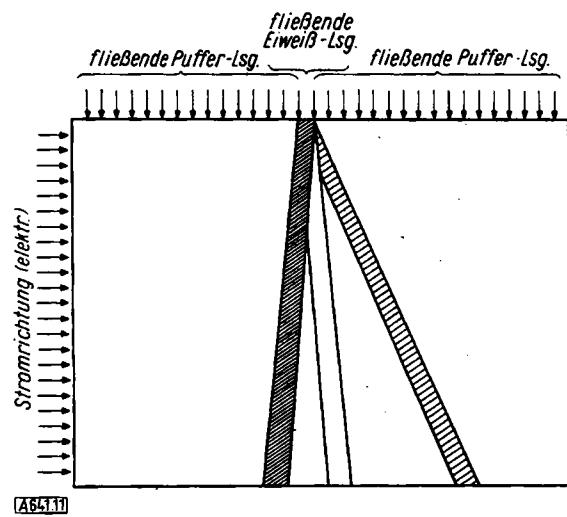


Bild 11  
Kontinuierliche Zonenelektrophorese

wird, dessen Pumpgeschwindigkeit mit der elektrischen Stromstärke durch das Elektrophoresegefäß synchronisiert ist. Außerdem werden Elektrodenflüssigkeiten und Pufferlösungen derart gewählt, daß die Grenzflächen zwischen ihnen sich sehr wenig oder gar nicht bewegen. Durch diese Methode kann man beträchtliche Mengen von elektrophoretisch reinen Serumkomponenten isolieren, auch von denen, die nur in relativ kleinen Mengen vorkommen, wie z. B. die schneller als Albumin wandernde sog. „Vorfraktion“<sup>20)</sup>. Für präparative Zwecke ist auch die Elektrophorese-Konvektionsmethode von Cann, Brown und Kirkwood<sup>21)</sup> manchmal sehr nützlich.

Die große Spezifität der elektrophoretischen Methoden ist auffallend und beruht wohl zum Teil darauf, daß zwei Substanzen nur selten über das gesamte  $p_{\text{H}}$ -Gebiet dieselbe Beweglichkeit haben, und daß man mit modernen Methoden auch kleine Beweglichkeitsunterschiede zur Trennung ausnutzen kann. Die ausgeprägten elektrochemischen Unterschiede zwischen biologisch wichtigen Substanzen, wie Enzymen und anderen Eiweißkörpern, Nucleinsäure-Komplexen usw. hat vielleicht auch physiologische Bedeutung. Anderseits sollte man sich selbstverständlich auf diesem Gebiet nie auf eine einzige Methode verlassen.

### Chromatographie

Die chromatographische Methode ist durch ihre hohe Spezifität ausgezeichnet, die auf ganz anderen Eigenschaften beruht, als denjenigen, die für die elektrochemischen Unterschiede maßgebend sind. Hier spielen Oberflächenaffinitäten und Löslichkeitseigenschaften von oft außerordentlich fein ausgeprägter Spezifität eine große Rolle. Die Kombination derartiger Methoden mit der Elektrophorese ist wohl eben deshalb so fruchtbar.

<sup>19)</sup> I. Brattsten, Arkiv Kemi, im Druck.

<sup>20)</sup> F. W. Aly, Biochem. Z. 325, 505 [1954].

<sup>21)</sup> J. R. Cann, R. A. Brown u. J. C. Kirkwood, J. Amer. chem. Soc. 71, 1603, 1609 [1949].

Es seien einige neue oder verbesserte Verfahren auf dem chromatographischen Gebiet aus unserem Laboratorium kurz erwähnt. Sodann seien besonders zwei Probleme behandelt: Die Chromatographie von hochmolekularen Stoffen, besonders von Eiweißkörpern, und die präparative Ausgestaltung der Chromatographie in der Protein- und Polypeptid-Chemie.

Die naheliegende Erweiterung der chromatographischen Methoden auf hochmolekulare Körper hin ist von vielen Forschern versucht worden, aber nur teilweise mit Erfolg. Ionenaustauscher, wie IRC-50, können für die Chromatographie niedrigmolekularer Eiweißkörper, wie Cytochrom C, Ribonuclease, Lysozym sehr gut benutzt werden — eine Grenze wird hier wahrscheinlich nur durch die Porenweite des Austauschermaterials gesetzt<sup>22, 23)</sup>. Auch Hämoglobin läßt sich auf Ionenaustauschern chromatographieren. Die Verteilungschromatographie war auch bei verschiedenen niedrigmolekularen Eiweißkörpern erfolgreich, z. B. bei Ribonuclease und Insulin<sup>24-27)</sup>. Eine hochmolekulare Substanz wird sich bei der Verteilung zwischen zwei Phasen entweder ganz in der einen oder ganz in der anderen Phase ansammeln, wenn die beiden Phasen nicht sehr ähnlich sind. Lösungsmittelpaare mit genügend ähnlicher Zusammensetzung haben die genannten Autoren durch Zusatz von Neutralsalzen zu Glykol-Wassermischungen hergestellt. Dadurch erhält man zwei Phasen von fast gleicher Zusammensetzung, so daß eine wirkliche Verteilung auch mit hochmolekularen Stoffen auftreten kann.

Chromatographie auf Adsorptionssäulen bereitet mit Proteinen viele Schwierigkeiten, die wahrscheinlich wohl mit der Langsamkeit der Desorption und vielleicht auch mit Denaturierung zusammenhängen. Anderseits werden Adsorptionsmittel oft in der präparativen Protein- und Enzym-Chemie benutzt und sind oft durch hohe Spezifität ausgezeichnet.

Wir haben in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Adsorptionsmitteln auf ihre Anwendbarkeit für die Proteinchromatographie durchgeprüft. Danach sind bestimmte Modifikationen von gefälltem Calciumphosphat auch für hochmolekulare Proteine verwendbar<sup>28, 29)</sup>. Die von uns benutzten Präparate haben Brucit- oder Hydroxylapatit-Struktur und sind im allgemeinen Mischungen von beiden, wie man sie aus Lösungen von Calciumchlorid und sek. Natriumphosphat unter verschiedenen Bedingungen ausfällen kann.

Diese Phosphate lassen sich sehr leicht als Säulen packen, durch die die Lösungen gut durchfließen. Sie geben kein ultraviolet-absorbierendes Material in die Lösung ab, was für die nachträglichen photometrischen Bestimmungen wichtig ist. Vor allem erlauben sie eine Elution von Proteinen in oft ziemlich scharfe Zonen, wobei die zur Elution erforderliche Pufferkonzentration oder der notwendige  $p_{\text{H}}$ -Wert für verschiedene Proteine ausgeprägt verschieden sind. Die Stabilität der Säulen gegen verschiedene Pufferlösungen ist noch nicht ganz geklärt; wahrscheinlich gibt es in diesen Systemen Umwandlungen zwischen den verschiedenen Modifikationen von Calciumphosphaten.

Für die ersten Versuche war es sehr bequem, farbige Eiweißstoffe zu benutzen, und wir haben zu diesem Zweck hauptsächlich die beiden Algenproteine Phycoerythrin und

<sup>22)</sup> S. Paleus u. J. B. Neilands, Acta Chem. Scand. 4, 1204 [1950].

<sup>23)</sup> C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry 200, 493 [1953].

<sup>24)</sup> D. Herbert u. J. Pinsent, Biochemic. J. 43, 193 [1948].

<sup>25)</sup> A. J. P. Martin u. R. Porter, Biochemic. J. 49, 215 [1951].

<sup>26)</sup> R. Porter, Biochemic. J. 53, 320 [1953].

<sup>27)</sup> R. Porter, Brit. Med. Bull. 10, 237 [1954].

<sup>28)</sup> S. M. Swingle u. A. Tisellius, Biochemic. J. 48, 171 [1951].

<sup>29)</sup> A. Tisellius, Arkiv Kemi 7, 443 [1954]; dort auch frühere Literatur.

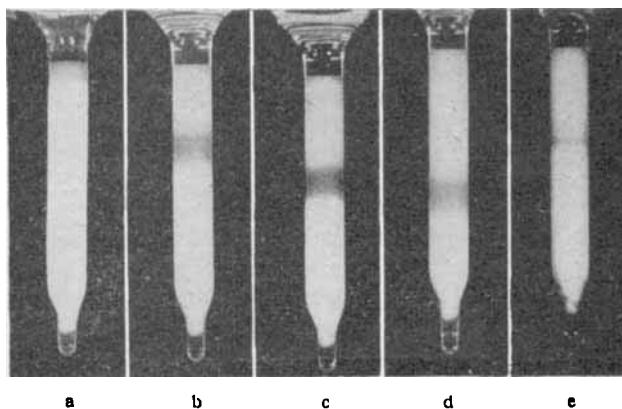


Bild 12

Chromatographie von einer Mischung aus zwei Eiweißkörpern, Phycoerythrin und Phycocyan, in einem Extrakt aus *Ceramium rubrum*. Säule aus Calciumphosphat. Elution von Phycoerythrin mit 0.005 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (a-d) und von Phycocyan mit 0.003 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (e). (Tiselius, Arkiv Kemi 7, 443 [1954])

Phycocyan aus *Ceramium rubrum* benutzt. Bild 12 zeigt ihre Trennung. Bei einer Phosphatpuffer-Konzentration von ca. 0,005 M bzw. 0,03 M wurden sie eluiert. Das Elutionsintervall, d. h. die Änderung der Pufferkonzentration, die zur Elution einer festliegenden Zone erforderlich ist, ist meistens verhältnismäßig eng. Dies erleichtert in hohem Maße die Trennung. Das scheint für Proteine und vielleicht auch für andere hochmolekulare Substanzen charakteristisch zu sein und ist wohl eine Folge davon, daß viele Gruppen an jeder Molekel an der Adsorption beteiligt sind. Zur quantitativen Elution eines Eiweißkörpers muß die Adsorption stark herabgesetzt werden, sonst werden die Zonen zu breit. Wahrscheinlich verläuft die Gleichgewichtseinstellung in der Säule nur bei schwacher Adsorption genügend schnell, und die Trennung ist hauptsächlich auf ein „alles oder nichts“-Prinzip begründet, wenn die Konzentration oder der  $\text{pH}$ -Wert der eluierenden Pufferlösung schrittweise oder kontinuierlich verändert werden. Im Gegensatz dazu macht man in der gewöhnlichen Chromatographie meistens von der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit ( $R_f$ -Werte) in einem konstanten Medium Gebrauch.

#### Farblose Substanzen

Farblose Eiweißkörper lassen sich entsprechend chromatographieren, wenn man das Eluat in einem Fraktionsammler auffängt und dann auf Protein analysiert. Dabei ist es bequem, sich der „Gradientelution“ zu bedienen, das heißt einer automatischen Anordnung, die eine Elutionslösung kontinuierlich wachsender Konzentration liefert. Indessen ist es manchmal noch bequemer, die Wanderung der Zonen in der Säule direkt beobachten zu können und die Vorlagen entsprechend zu wechseln. Da die meisten Eiweißkörper im kurzweligen Ultraviolet bei ungefähr 270–280  $\text{m}\mu$  absorbieren, verwenden wir zum Sichtbarmachen diese UV-Absorption, wie es früher bereits in Uppsala zur Beobachtung von Sedimentation und Elektrophorese geschah. Die Säule wird hierzu in ein Quarzglasrohr gepackt und durch Quarz-Quecksilberlampen beleuchtet. Man photographiert mit einer Quarzlinse auf blauempfindlichen Platten unter Einschaltung zweier Quarzküvetten mit Chlor- bzw. Brom-Füllung als Filter. Noch besser ist eine Kombination zweier Quarzküvetten, von denen eine mit einer Kobalt-Nickel-sulfat-Lösung und die andere mit einer wäßrigen Lösung von „Cation X“ (2,7-Dimethyl-diaza-(3,6)-cycloheptadien-1,6-jodid) gefüllt

ist<sup>20</sup>). Bild 13 zeigt solche Aufnahmen. Das Bild kann aber auch direkt auf einem Fluoreszenzschirm beobachtet werden. Wir haben kürzlich zum Verfolgen der Proteinchromatographie auch eine Fernsehkamera mit einem ultraviolettempfindlichen Vidiconrohr eingeführt, das uns durch die *Radio Corporation of America* zur Verfügung gestellt wurde.

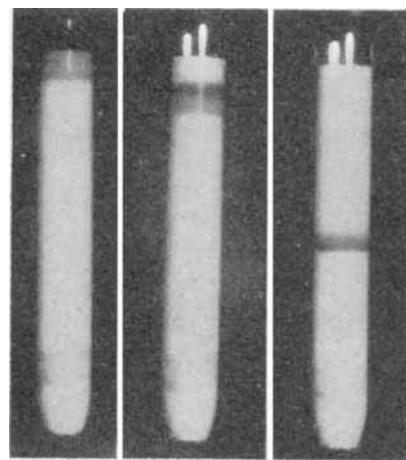


Bild 13

Chromatographie von Serumalbumin auf einer Säule von Calciumphosphat. (Tiselius, Arkiv Kemi 7, 443 [1954])

Diese Kamera, an einen gewöhnlichen Fernsehapparat angeschlossen, läßt sich (mit den oben genannten Filtern) sehr gut verwenden und gibt viel lichtstärkere Bilder als die Fluoreszenzschirme (Bild 14). Außerdem läßt sich der Kontrast mit dieser Anordnung leicht regulieren.

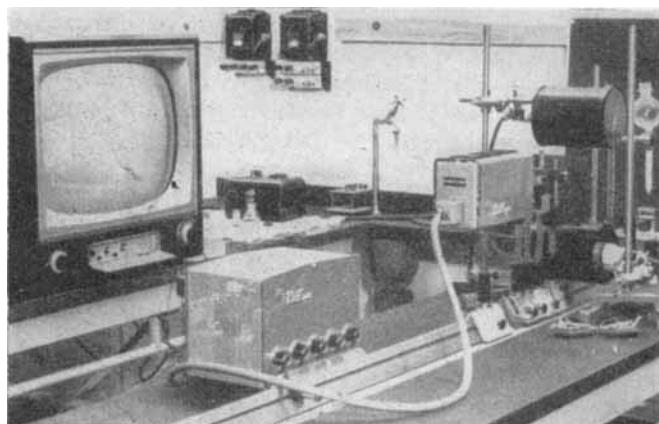


Bild 14  
Apparataufstellung zur Beobachtung der chromatographischen Analyse von Protein-Mischungen durch Ultraviolett-Fernsehen

Tabelle 2 gibt einige Ergebnisse der Protein-Chromatographie auf Calciumphosphat-Säulen. Man sieht die auffallend großen Unterschiede in der Elutionskonzentration. Es ist interessant, daß auch eine Substanz mit dem Molekulargewicht von 6 Millionen, wie das Hämocyanin, sich auf diesen Säulen chromatographieren läßt.

Die Protein-Chromatographie auf Calciumphosphat ist eine sehr bequeme Methode, die auch präparativ verwendbar ist. Es ist interessant, daß Substanzen, die in kleinen Konzentrationen zugegen sind, leicht auf der Säule konzentriert werden können, wenn man mit einem kräftigen Gradienten eluiert.

<sup>20</sup> M. Kasha, J. Opt. Soc. Amer. 38, 929 [1948].

Protein	Elutionsbereich
R-Phyoerythrin .....	0,005–0,008 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
R-Phycocyanin .....	0,030–0,040 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Ei-Albumin: Komponente I	0,005–0,007 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Ei-Albumin: Komponente II	0,010–0,012 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Menschliches Serum-Albumin	0,050–0,070 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Rinder-CO-Hämoglobin ...	0,040–0,050 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Schnecken-Hämocyanin ...	0,040–0,050 m Phosphat-Puffer $\text{p}_\text{H} = 6,7 + 0,2 \text{ m NaCl}$
Schnecken-Hämocyanin ...	0,008–0,010 m Phosphat-Puffer $\text{p}_\text{H} = 6,7$
Tabak-Mosaik-Virus .....	0,100–0,120 m Phosphat-Puffer $\text{p}_\text{H} = 6,7$

Tabelle 2

Sicher gibt es viele andere passende Adsorbentien, die sich zur Chromatographie von Eiweiß und ähnlichen Substanzen eignen. So haben z. B. *Söber* und *Petersen*<sup>31)</sup> die Verwendung von Ionen austauschern aus modifizierter Cellulose für solche Zwecke beschrieben und damit u. a. Serum und Enzyme chromatographiert.

Auf unseren Säulen läßt sich auch Tabakmosaik-Virus reinigen. Allerdings werden die Zonen durch Viscositätsstörungen stark verzerrt.

### Ausblick

Manche Eiweißkörper und auch Virusarten zeigen bei höheren Salzkonzentrationen, z. B. von Ammoniumsulfat, eine sehr viel stärkere Adsorption als aus salzfreiem Medium. Diese sog. „Aussalzungsadsorption“ (*Tiselius*<sup>1948<sup>32)</sup>) ist von verschiedenen Autoren ausgenutzt worden, um be-</sup>

sonders hochmolekulare Proteine, Viren und teilchenartige Formelemente aus Zellen zu isolieren (z. B. *Riley*<sup>33, 34)</sup>). Diese Beispiele seien genannt, um zu zeigen, daß die „obere Grenze“ der Teilchengröße noch nicht erreicht ist. Es liegt hier ein außerordentlich wichtiges Gebiet vor uns. Es handelt sich ja nicht nur um die Entwicklung von spezifischen Methoden zur Isolierung von Viren und ähnlichen sehr großen Molekülen, die ja noch manchmal als chemische Individuen anzusehen sind. Die Isolierung von partikelartigen Elementen aus biologischem Material hat während der letzten Jahre immer größere Bedeutung gewonnen. Studien über Mitochondrien, Mikrosomen und verschiedene Arten von Granula scheinen ganz neue Wege zum Verständnis biochemischer Reaktionen in der lebenden Zelle zu eröffnen. Die systematische Isolierung und Analyse von Zellfragmenten kann uns sehr wichtige Auskünfte über strukturelle Gesetzmäßigkeiten liefern. Selbstverständlich müssen dabei viele verschiedene Methoden benutzt werden; bisher haben wohl Zentrifugiermethoden die größte Rolle gespielt. Es scheint mir aber, daß sowohl Elektrophorese wie Chromatographie, die ja auf anderen Gebieten der Chemie eine so ausgeprägte Spezifität gezeigt haben, auch hier vieles leisten könnten, wenn die Verfahren den besonderen Problemen angepaßt werden. Man braucht nur an die Verwendung von Flotationsverfahren in der Technik zu denken, um einzusehen, daß neue, wichtige biochemische Anwendungen der Adsorption und ähnlicher Erscheinungen, auf denen die Chromatographie beruht, zu erwarten sind.

Eintrag am 31. Januar 1955 [A 641]

<sup>31)</sup> H. A. Söber u. E. A. Peterson, J. Amer. chem. Soc. 76, 1711 [1954].  
<sup>32)</sup> A. Tiselius, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 26 B, No. 1 [1948].

<sup>33)</sup> V. T. Riley, Science [Washington] 107, 573 [1948].

<sup>34)</sup> V. T. Riley, Science [Washington] 109, 361 [1949].

## Stofftrennungen durch Hochspannungs-Papierelektrophorese

Von Dr. G. WERNER und Prof. Dr. O. WESTPHAL

Dr. A. Wander-Forschungsinstitut, Säckingen/Baden

Es wird ein Verfahren beschrieben, mit welchem Papierelektrophoresen bei Spannungen bis zu 10000 Volt und Wanderungswegen bis zu 1 m möglich sind. Eine besondere Art des Aufbringens der Substanziösung auf den Papierstreifen wird beschrieben, sowie über eine Einrichtung berichtet, mit welcher es möglich ist, besonders lange Papierstreifen gleichmäßig und reproduzierbar anzufeuchten. Die Leistungsfähigkeit der Apparatur wird an Trennungen von Aminosäuren, Peptiden, Zuckern und anorganischen Ionen demonstriert.

Eine besondere Domäne der papierelektrophoretischen Analyse bei niederen Spannungen ist die weit verbreitete und eingehend ausgearbeitete Trennung der Serumproteine<sup>1)</sup>. Bei der Trennung von Substanzen mit kleinem bis mittlerem Molekulargewicht durch Niedervolt-Elektrophorese werden die Banden aber während längerer Laufzeiten durch Diffusion und andere Effekte so stark verbreitert, daß die erwünschte Trennschärfe nicht erzielt werden kann. Bei höheren Spannungen ist dagegen die Wanderungsgeschwindigkeit erheblich größer, die Laufzeit und damit auch die Diffusionseffekte sind vergleichsweise wesentlich kleiner. Andererseits muß die mit steigender Spannung quadratisch anwachsende Stromwärme abgeleitet werden, um ein Austrocknen des mit Elektrolyt anfeuchten Papierstreifens zu verhindern.

<sup>1)</sup> W. Grassmann u. K. Hannig, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 290, 1 [1951]; Klin. Wschr. 32, 838 [1954]; siehe z. B. auch J. Pieper u. H. Molinski, Klin. Wschr. 32, 985 [1954]; Ch. Wunderly: Die Papierelektrophorese, Verlag H. R. Sauerländer & Co. Aarau u. Frankfurt/Main, 1954.

*Michl*<sup>2)</sup> hat eine Anordnung zur Hochspannungs-Elektrophorese beschrieben, bei welcher der elektrolyt-getränkten Papierstreifen, in Anlehnung an ein von *Cremer* und *Tiselius*<sup>3)</sup> beschriebenes Verfahren, in Toluol eingehängt wird, welches die Stromwärme aufnimmt und gleichzeitig als Isolator wirkt. Das gleiche Verfahren benutzten *Kickhöfen* und *Westphal*<sup>4)</sup>, sowie *Turba*<sup>5)</sup> und *Lange*<sup>6)</sup>. *Markham* und *Smith*<sup>7)</sup> verwendeten zum gleichen Zweck Tetrachlorkohlenstoff, *Heilmeyer* und Mitarbeiter<sup>8)</sup> Hexan, und *Kickhöfen*<sup>9)</sup> neuerdings das billigere Heptan. — Ein anderes Prinzip der Wärmeableitung vom Elektrophorese-

<sup>2)</sup> H. Michl, Mh. Chem. 82, 489 [1951].

<sup>3)</sup> H. D. Cremer u. A. Tiselius, Biochem. Z. 320, 373 [1950].

<sup>4)</sup> B. Kickhöfen u. O. Westphal, Z. Naturforsch. 7 b, 655 [1952].

<sup>5)</sup> F. Turba, H. Petzer u. H. Schuster, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 296, 97 [1954].

<sup>6)</sup> G. Lange, Biochem. Z. 326, 172 [1955].

<sup>7)</sup> R. Markham u. J. D. Smith, Nature [London] 168, 406 [1951].

<sup>8)</sup> L. Heilmeyer, R. Clotter, J. Sano, A. Sturm u. A. Lipp, Klin. Wschr. 32, 831 [1954].

<sup>9)</sup> B. Kickhöfen, persönl. Mitteilung.