

Analytische und mikropräparative Trägerelektrophorese mit höheren Spannungen

Von Prof. Dr. TH. WIELAND und Dr. G. PFLEIDERER

Aus dem Institut für Organische Chemie an der Universität Frankfurt/Main

Mittels einer gekühlten Elektrophoresekammer konnten auf Papier bzw. Trägerschichten bei einem Spannungsgefälle bis zu 60 V/cm u. a. verschiedene biochemische Substanzen (Eiweißkörper) und organische Reaktionsgemische, aber auch anorganische Anionen getrennt werden. Aus einem Phalloidinhydrolysat wurde eine neue Aminosäure der Summenformel $C_6H_{12}O_4N$ abgetrennt. Die Apparatur gestattet auch Trennungen in präparativem Maßstab.

Einleitung

Die guten Erfahrungen, die in unserem und vielen anderen Laboratorien bei der Trennung verschiedener Stoffe durch Elektrophorese auf puffergeränktem Filtrerpapier seit der ersten Beschreibung einer einfachen „feuchten Kammer“¹⁾ gemacht worden sind, haben zahlreiche Arbeitskreise zur Weiterentwicklung des Verfahrens angeregt. Als entschiedene Fortschritte sind zwei Verbesserungen zu nennen, die zu einer erheblichen Steigerung der Trennschärfe geführt haben:

1.) Die Verwendung höherer (50–100 V/cm) als der von uns ursprünglich benützten (10–15 V/cm) Spannungen²⁾ zur Abkürzung der Laufzeit und damit der die Trennschärfe verminderten Diffusion der Substanzflecken. Die durch die Hochspannung bedingte erhöhte Stromstärke führt zu starker Erwärmung des Papierstreifens, der man durch Eintauchen in eine Kühlflüssigkeit (Toluol, Benzin) oder Auflegen auf eine gekühlte Unterlage begegnet.

2.) Die Verringerung des Feuchtigkeitsgrades des Papierstreifens durch Auspressen weit unter die freiwillige Flüssigkeitskapazität³⁾. Hierdurch bleiben der Stromdurchgang und damit die Erwärmung niedrig; die störenden Diffusionseffekte verringern sich beim Mangel an „freiem“ Wasser. Um den Streifen vor neuerlichem Vollsaugen aus den puffergefüllten Elektrodengefäßen zu bewahren, schaltet man zwischen Papierstreifen und die Elektrodengefäße Cellophanmembranen ein, die den Durchgang von Flüssigkeit, nicht aber den von Ionen sehr stark hemmen. Auch die Elektroendosmose, der meist zur Kathode gerichtete Flüssigkeitsstrom im Träger, wird damit stark reduziert.

Unter Beachtung dieser beiden wichtigen Prinzipien haben wir in den letzten Jahren an der Verbesserung unseres ursprünglichen Apparates weiter gearbeitet und nunmehr ein Gerät zur Trägerelektrophorese entwickelt, dessen Konstruktion und Leistungsfähigkeit im folgenden beschrieben wird.

Technische Einzelheiten

Von der vielfach geübten einfachen Technik des Eintauchens der Papierstreifen in mit Wasser nicht mischbare organische Flüssigkeiten zur Kühlung haben wir nach mehrfachen Vorversuchen abgesehen. Somit kam nur die andere Möglichkeit, Kühlung durch Auflage des Trägers auf eine gekühlte Unterlage in Betracht, nachdem mehrere Versuche, die nötige Kühlung durch starke Erniedrigung der Außentemperatur zu besorgen, nicht das erwünschte Ergebnis gebracht hatten. Bei der Wahl der gekühlten Unterlagen kamen im Prinzip gut isolierte Metall-, Glas- oder Kunststoffplatten in Betracht. Metalle

mit ihrer besonders guten Wärmeleitfähigkeit lassen sich jedoch nach unseren Erfahrungen nicht auf die Dauer gegen eine Spannung von mehreren 1000 V isolieren, zudem erhöhen sie das Gewicht der Trennapparatur. Organische Kunststoffe auf der anderen Seite haben den Vorteil der Leichtigkeit und bequemen Verarbeitbarkeit. Trotzdem haben wir uns zur Verwendung von Glasplatten entschlossen, die gegenüber den Kunststoffen eine ca. 7 × bessere Wärmeleitfähigkeit aufweisen.

Da mit der großen Trennschärfe auch die Möglichkeit zur Gewinnung von Substanzmengen im Maßstab von 5 mg verbunden werden sollte, wurde auf eine möglichst breite Lauffläche (40 cm) Wert gelegt, die das Aufbringen von ca. 25 mg Substanz in einem Strich ihrer Lösung ermöglicht. Als Länge für die gesamte Trennstrecke erschien uns ebenfalls 40 cm in den allermeisten Fällen zu genügen. So wurde eine in Bild 1 skizzierte und in Bild 2 photo-

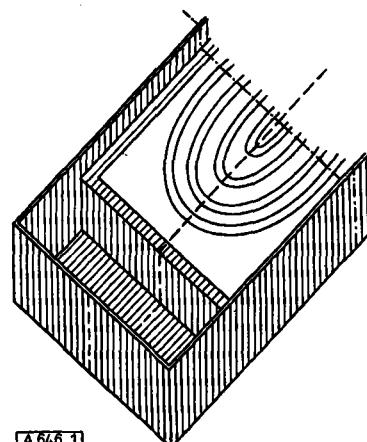


Bild 1
Ansicht einer Hälfte der Elektrophoresekammer (Elektrodenraum)



Bild 2
Die beiden Kühltsche mit Elektrodenräumen; vorne mit aufgelegtem Papierbogen und Elektrodenzungen

¹⁾ Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwiss. 35, 29 [1948]; diese Ztschr. 60, 313 [1948].

²⁾ H. Michl, Mh. Chemie 82, 489 [1951]; 83, 737 [1952].

³⁾ R. Wetz, Helv. chim. Acta 34, 2031 [1951].

graphierte Kammer konstruiert, die in ihrem Boden und den Wänden aus Vinidur (Polyvinylchlorid) zusammengeschweißt ist und als obere Deckplatte eine 3–4 mm starke Glasplatte trägt, welche mit einem Spezialkitt auf einen Kunststoffrand aufgeklebt ist. In der so gebildeten Kammer befindet sich zur Kühlung ein spiralförmig angeordnetes Röhrenaggregat, das mit einer kleinen Kühlmaschine (250 Kcal/h) verbunden ist und nach Wahl eingestellt werden kann. Die Wärmeübertragung zwischen Glas und Metallröhren wird durch eine Glykol-Wassermischung besorgt, mit der die Kühlkammer gefüllt ist. Die Wärmeableitung ist so gut, daß man auch in Trägerschichten von 5 mm Dicke bei 25 V/cm bei 0–5 °C arbeiten kann. Die Kammer trägt zum Volumenausgleich ein seitliches Niveaurohr. Die beiden Endwände des Kühltschs bilden mit den Außenwänden des Apparats die zur Aufnahme der Pufferlösung vorgesehenen Elektrodenräume. In diesen sind zwei Platin-Bänder angebracht, die mit einem Spannungsvervielfacher nach dem Kaskadenprinzip⁴⁾ zur Lieferung des Gleichstroms verbunden sind. Diese Spannungsquelle liefert 3000 Volt.



[A 646.3]

Bild 3. Querschnitt durch einen Teil

Zur Herstellung der leitenden Verbindung zwischen dem Träger und den Elektrodenräumen taucht in diese eine 40 cm breite Zunge aus Papier oder Textil, deren obere Kante mit einem Cellophanumschlag versehen ist⁵⁾ (s. Bild 3). Dieser wird fest mit dem pufferfeuchten Träger



Bild 4. Gesamtansicht

in Kontakt gebracht. Eine Gesamtansicht der aus diesen Einzelteilen zusammengestellten Apparatur ist in Bild 4 wiedergegeben.

Elektrophorese auf Papier⁶⁾

Der Papierbogen (40×40 cm oder kleiner) wird mit der geeigneten Pufferlösung getränkt, überschüssige Flüssigkeit zwischen Gummiwalzen ausgepreßt, auf die gekühlte

⁴⁾ Konstruiert von Dr. Manfred Wilk.

⁵⁾ Beim Arbeiten mit sauren Puffern hat sich besonders Whatman Nr. 1, im neutralen daneben auch Schleicher & Schüll 2043b, bewährt.

Glasplatte gelegt und dort gut und gleichmäßig angedrückt (Gummiwalze). Dann trägt man mit der Kapillare an vorgezeichneter Stelle die Lösung des Substanzgemisches als langen scharfen Querstrich ein- oder mehrmals oder mehrere zu vergleichende Substanzproben als kurze Striche auf, legt die Cellophanenden der Elektrodenzungen auf, bedeckt alles mit einer passenden schweren Glasplatte und schaltet den Strom ein. Bei 2500 V Spannung zwischen den Elektrodenräumen (60 V/cm) fließt bei Verwendung von einem Puffer des p_{H} 6,5 (100 cm³ Pyridin-10 cm³ Eisessig-890 cm³ Wasser⁷⁾) in 1 cm Breitenstreife ein Strom von 2,5 mA, also im großen Bogen bis 100 mA. Im sauren Puffer (p_{H} 1,9) aus 150 cm³ Eisessig, 50 cm³ Ameisensäure und 800 cm³ Wasser⁸⁾ wird nur eine Stromstärke von 0,5 mA erreicht. Starke Elektrolyte lassen nicht so hohe Spannungen zu, doch ist infolge der wirksamen Kühlung auch hierbei das Arbeiten bei 30–35 V/cm möglich.

Elektrophorese in Trägerschichten

Die Trägermasse, z. B. Stärke oder Cellulose-Pulver, wird mit dem Puffer zu einem homogenen Brei angerührt, den man auf die Kühlplatte aufgießt. Zur seitlichen Begrenzung können Leisten aus Vinidur im gewünschten Abstand parallel aufgelegt werden. Nach dem Aufgießen bis etwa 5 mm Höhe entfernt man den überschüssigen Puffer durch Abpressen mit dickem Saugpapier und ebnet die Oberfläche der nunmehr steifen Masse mit einer Walze. Die Substanz (250–500 mg) wird in eine etwa 4 mm breit ausgeschnittene, querlaufende Startrinne mit Puffer und Träger angeteigt eingestrichen. Sodann legt man wie oben die Cellophanzungen auf, bedeckt mit einer Glasplatte und schaltet den Strom ein.

Bei Verwendung von 0,075 mol Veronalpuffer (p_{H} 8,6) fließt in einer 30 cm breiten und ebenso langen Schicht aus Stärke (300 g) ein Strom von insgesamt 80–100 mA bei einer Spannung von 20 V/cm. (1400 V zwischen den Elektrodengefäß). Die Temperatur steigt dabei nicht über 5 °C, wenn die Kühlung auf –10 °C eingestellt ist.

Ergebnisse

1. Trennung der Aminosäuren eines Proteinhydrolysats.

a) Bild 5 zeigt das Pherogramm der Aminosäuren eines

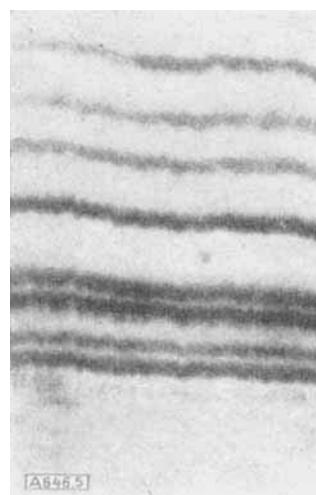


Bild 5
Aminosäuren eines Hämoglobin-hydrolysates p_{H} 1,9, 50 V/cm, 80 min (1/8 natürl. Größe)

⁶⁾ B. Kickhöfen u. O. Westphal, Z. Naturforschg. 7b, 655 [1953].

Hydrolysats von Pferdehämoglobin. Zur Identifizierung wurde, wie aus Bild 6 ersichtlich, in mehreren Vergleichsproben auf den breiten Bogen die Lage der Komponenten bestimmt.

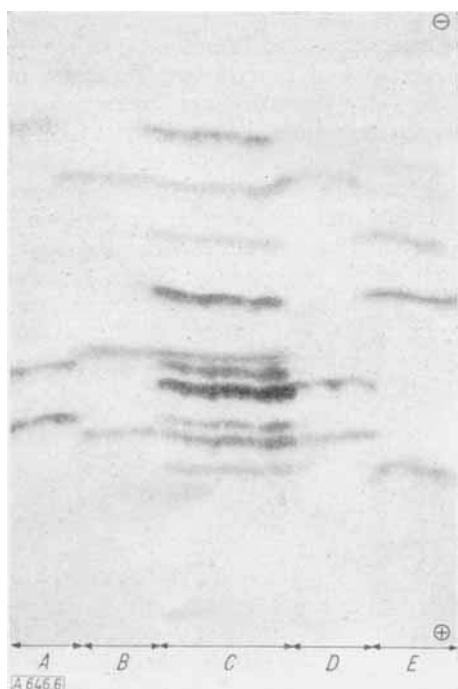


Bild 6

Identifizierung der Aminosäuren eines Hämoglobin-hydrolysates (Bedingungen siehe Bild 5) ($\frac{1}{4}$ nat. Größe). A: Glutaminsäure, Valin, Lysin; B: Asparaginsäure, Serin, Histidin; C: Hydrolysat; D: Phenylalanin, Leucin, Arginin; E: Tyrosin, Alanin, Glycin

b) Trennung biologisch wichtiger Phosphorsäure-Verbindungen. In Bild 7 ist das Pherogramm einer Mischung von Adenosin-mono-, di-, tri-phosphorsäure, anorganischem Phosphat und Phospho-enol-brenztraubensäure (PEB) wiedergegeben. Der Nachweis gelang durch Be-sprühen mit Ammoniummolybdat⁷⁾.

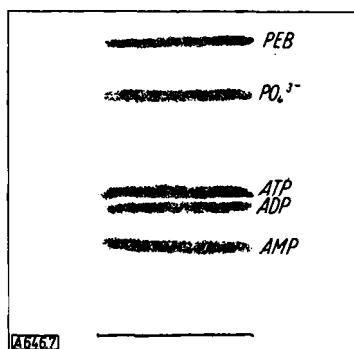


Bild 7
Trennung einiger Phosphorsäure-Verbindungen. pH 6,5, 50 V/cm, 120 min ($\frac{1}{3}$ natürliche Größe)

c) Trennung der Ninhydrin-positiven Substanzen eines Extraks von Schweinhypophysenvorderlappen (mit Dipl.-Chem. K. Dose). Die in Bild 8 aufgetrennten Substanzen wurden nicht identifiziert; sie sind zum Teil Peptide.

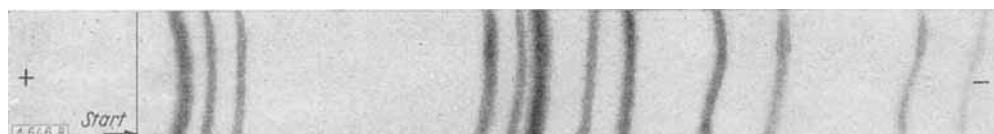


Bild 8. Aminosäuren und Peptide des HVL-Extraktes. pH 1,9, 50 V/cm, 90 min

⁷⁾ C. S. Hanes u. F. A. Isherwood, Nature [London] 164, 1107 [1949].

2. Isolierung einer neuen Aminosäure aus dem Phalloidin-hydrolysat (mit Dipl.-Chem. W. Schön).

Analytisch konnte im Hydrolysat des Pilzgifts Phalloidin eine bei neutralem pH zur Kathode wandernde Ninhydrin-positive Komponente erkannt werden. Die mikropräparative Abtrennung gelang in unserer Apparatur auf 30 Bogen aus dem Hydrolysat von 1 g des Giftstoffs. Durch Elution und nachfolgende Kristallisation aus Alkohol mit Äther erhielt man 50 mg eines analysenreinen Hydrochlorids der Zusammensetzung $C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$, das das Lactonsalz einer Aminosäure $C_8H_{12}O_4N$ darstellt. Die Struktur konnte als die der α -Amino- γ, δ -dihydroxy-isocapronsäure ermittelt werden⁸⁾. Bei der Ausführung der Strukturaufklärung des Phalloidins konnte zur Auftrennung der bei der Partialhydrolyse entstehenden Peptide erfolgreich von der beschriebenen Elektrophoreseapparatur Gebrauch gemacht werden.

3. Analyse und Trennung eines Reaktionsgemisches (mit Dr. Ch. J. Stewart).

Als Beispiel für die Anwendbarkeit der Methode auf präparative Probleme sei die Auftrennung der Reaktionsprodukte in Bild 9 wiedergegeben, die bei der Einwirkung von Athylenimin auf Glutathion in wässriger Lösung entstehen. Die Komponente aus den Startlinien von 10 Bogen wurde eluiert und zur Kristallisation gebracht.

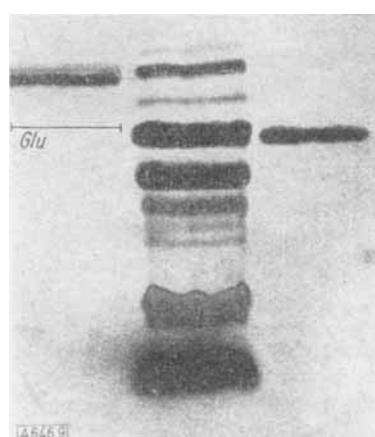


Bild 9. Reaktionsansatz von Glutathion + Athylenimin in Wasser (Mitte), Ninhydrin-positive Substanzen. Links Glutathion, rechts die isolierte Verbindung (siehe Text). pH 6,5, 50 V/cm, 60 min

4. Verfolgung einer Enzymreaktion (mit W. Gruber).

In Bild 10 wird der zeitliche Verlauf der Einstellung des Transaminierungsgleichgewichts:

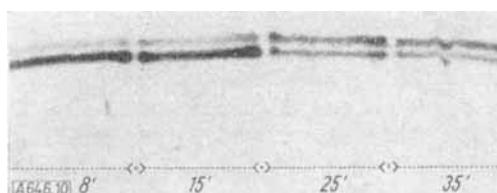


Bild 10
Verfolgung der enzymatischen Umaminierung von Glutaminsäure und Oxalessigsäure, getrennt bei pH 6,5, 50 V/cm, 40 min

Oxalessigsäure + Glutaminsäure = α -Keto-glutarsäure + Asparaginsäure gezeigt. Es wurden aus dem Enzymansatz nach 8, 15,

⁸⁾ Th. Wieland u. W. Schön, erscheint demnächst in Liebigs Ann. Vgl. den Vortragsbericht, diese Ztschr. 67, 283 [1955].

25, 35 min Proben entnommen und elektrophoretisch analysiert. Nach der kurzen Einwirkungsdauer ist neben viel Glutaminsäure wenig Asparaginsäure vorhanden, deren Menge auf Kosten der ersteren im Laufe der Zeit zunimmt.

5. Trennung anorganischer und organischer Anionen (mit Dipl.-Chem. K. Dose).

Bild 11 stellt im Mittelteil das Pherogramm einer Mischung von Natriumchlorit, -chlorat und -hypochlorit dar,

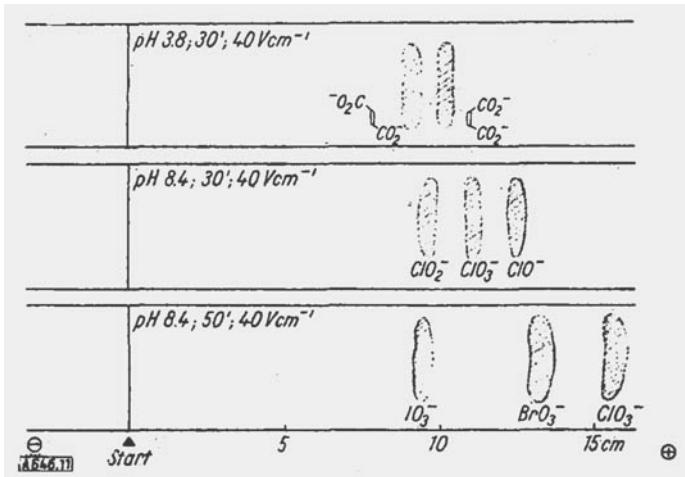


Bild 11
Trennung von Anionen

die sich glatt voneinander trennen und mit Kaliumjodid-Stärke nachweisen lassen. Unten sieht man die Trennung von Jodat, Bromat und Chlorat, oben die von Fumarat-Maleinat. Die in biologischen Flüssigkeiten vorkommenden Ionen des K, Na, Ca, SO₄, Cl, PO₄ zeigen gegenüber den meisten biochemischen Inhaltsstoffen eine so große Wanderungsgeschwindigkeit und Unterschiede im elektrischen Feld, daß man sie auf dem breiten Bogen bequem elektrophoretisch voneinander trennen, vor allem aber entfernen kann. Somit ist eine einfache Entsalzung kleinerer Flüssigkeitsmengen möglich.

6. Präparative Trennung von Eiweißkörpern (mit Dipl.-Chem. Elfriede Niemann).

Um die Leistungsfähigkeit der Apparatur zur Eiweißtrennung in pufferhaltiger Trägerschicht kennenzulernen, wurde zunächst das einfache Gemisch aus gleichen Teilen Serum-Albumin (Rind) und Hämoglobin (Pferd) untersucht. Insgesamt 80 mg Eiweißmischung ließen sich in der oben beschriebenen Weise innerhalb von 4 h um 7 cm voneinander in parallelen Banden trennen. Dabei konnte an dem sichtbaren Hämoglobin beobachtet werden, daß sich die Bande auf etwa 3 cm verbreitert. Anschließend wurden die eiweißhaltigen Stärkebezirke separat eluiert, und zwar das Albumin mit ca. 30 cm³ Wasser, das Hämoglobin mit 40 cm³ 5 proz. Kochsalzlösung. In den Eluaten wurde beim Albumin mit der Biuret-Reaktion, beim Hämoglobin optisch bei 284 m μ der Eiweißgehalt ermittelt und gefunden, daß 80–90 % der Proteine wieder erhalten wurden.

Anschließend wurden die Eiweißkomponenten des menschlichen Blutsersums präparativ getrennt. Hierzu wurden 3 cm³ Serum (etwa 200 mg Eiweiß) mit 1 cm³ Veronal-Puffer vom pH 8,6 verdünnt und 6 $\frac{1}{2}$ h der Elektrophorese in Stärke und demselben Puffer bei 20 V/cm unterworfen. Wegen der schwierigen direkten Nachweismöglichkeit von Eiweiß auf dem Träger wurde dieser empirisch in drei gleiche Teile zerlegt, aus denen die Fraktionen mit 5 proz. Kochsalzlösung wie oben eluiert und im nativen Zustand erhalten wurden. Bild 12 zeigt die zur Kontrolle ausgeführten Paperelektropherogramme nach Anfärbung mit Amidoschwarz 10B im Vergleich zum Gesamtserum. Die Ausbeuten waren: an Fraktion I (Albumin): 98 mg, an Fraktion II (Zwischenfraktion): 38 mg, und an Fraktion III (γ -Globulin): 12 mg. Insgesamt wurden also 148 mg = ungefähr 75 % des Gesamteiweißes als ziemlich reine Fraktionen isoliert. Die bei den Elutionen in Lösung gehenden geringen Stärkemengen stören bei der Biuret-Reaktion praktisch nicht.

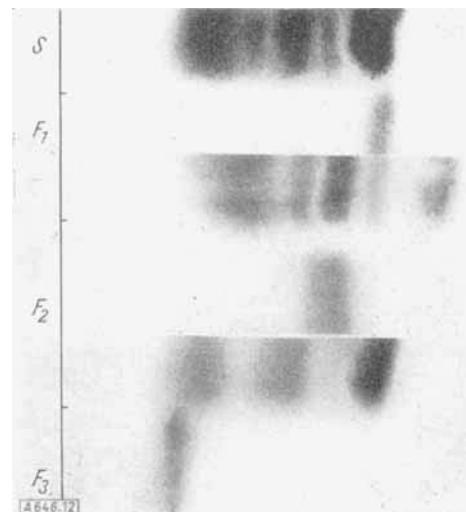


Bild 12
Analyse der durch Elektrophorese in Stärkebret getrennten Protein-Fraktionen aus Humanserum, jeweils im Vergleich mit Gesamtserum. Oben 1., Mitte 2., unten 3. Fraktion

Die beschriebene Anordnung hat sich auch beim Arbeiten mit isotop-markierten Substanzen gut bewährt. Hierbei ist eine scharfe analytische Trennung und nachträgliche Bestimmung der getrennten Stoffe mit dem fensterlosen Zählrohr auf dem Streifen möglich, sowie die Gewinnung reiner, auf andere Weise schwierig zu reinigender markierter Substanzen im Maßstabe von 10–100 mg^a).

Den Herren Prof. Dr. O. Westphal und Dr. G. Werner, Säckingen, danken wir für den Erfahrungsaustausch bei der Konstruktion der Geräte, Herrn R. Heumaier, Frankfurt, für den bei der praktischen Entwicklung bewiesenen technischen Eifer.

Eingeg. am 29. März 1955 [A 646]

^a) Das beschriebene Gerät wird von der Fa. L. Hormuth Inh. W. E. Vetter, Heidelberg-Wiesloch, hergestellt.