

Verfahren zur Wiedergewinnung von Proteinen aus Trägerschicht-Elektropherogrammen

Von Prof. Dr. TH. WIELAND, Priv.-Doz. Dr. G. PFLEIDERER und cand. chem. H.-L. RETTIG

Aus dem Institut für Organische Chemie und seiner Biochemischen Abteilung, Universität Frankfurt/M.

Proteine, die man durch Elektrophorese in Trägerschichten, am besten in Stärke-Schichten, getrennt hat, lassen sich dadurch mit guter Ausbeute gewinnen, daß man zum geeigneten Zeitpunkt vor die abgetrennte Bande einen mit Puffer angeteigten Glaspulverbrei in die Trägerschicht als Riegel einbaut, in den das Protein elektrophoretisch hineingedrängt wird. Aus dieser Auffangzone lassen sich die Eiweißstoffe mit wenig Flüssigkeit zu über 90% eluieren.

Eine der wirksamsten Trennungsoperationen für Eiweißgemische ist die Elektrophorese auf Trägerschichten, die allerdings, besonders wenn es sich um leicht denaturierbare Proteine handelt, wirksam gekühlt sein müssen. Eine hierfür geeignete Apparatur¹⁾ haben wir vor einigen Jahren beschrieben²⁾ und seither mit Erfolg auch zu Enzym-Trennungen^{3, 4)} herangezogen. Hierbei diente Stärke als Trägermaterial, die sich bei der Elektrophorese der Blutproteine gut bewährte und auch eine weitgehende Elution der getrennten Komponenten zuließ. Beim Hämoglobin betrug die Ausbeute an wiedergewonnener Substanz ca. 80%²⁾. Leider trifft dieser günstige Umstand nicht für alle Proteine zu. Die Milchsäure-dehydrogenasen aus Organen verschiedener Tierarten lassen sich zwar durch Trägerelektrophorese, und nur hiermit, voneinander trennen und unterscheiden^{3, 4)}, doch hat eine quantitative Bestimmung gezeigt, daß bei der Elution aus der Stärke mit verschiedenen Pufferlösungen manchmal nur 10 bis 15% der Enzymaktivität wieder gewonnen werden können. Außerdem enthalten die Eluate immer etwas gelöste Stärke, die, wie im Fall der Transaminasen, nach dem Gefriertrocknen ausfällt und das Enzym adsorbiert, oder bei Ammonsulfat-Fällungen mit niedergeschlagen wird. Dies veranlaßte uns, außer der Stärke als Trägermaterial andere feingepulverte Stoffe zu untersuchen und, da diese Versuche zu keinem deutlichen Erfolg führten, eine Methode zur elektrophoretischen Einwanderung der Proteinbanden aus der Stärke-Schicht in eine solche von leicht eluierbaren Pulvern auszuarbeiten.

Anordnung

Das auf seine Trägereignung zu prüfende Pulver wird mit Pufferlösung zu einem sehr steifen Brei homogen angerührt. Auf die gekühlte Glasplatte des Pherographen¹⁾ legt man einen Kunststoffrahmen von 16×30 cm und 0,6 cm Dicke und füllt den Innenraum mit dem Trägerbrei luftblasenfrei bis zur gewünschten Höhe (meist 0,5 cm) auf, preßt mit Filterpapier die Oberfläche der Füllung unter Glättung stark ab und entfernt die Schablone. Aus dieser Schicht wird nun nahe der Kathodenseite ein 15 cm langer, 0,5 cm breiter Quergraben ausgehoben, der zur Aufnahme der ebenfalls mit Trägermasse zum Brei angeteigten Eiweißlösung dient. Dieser Brei wird ebenfalls blasenfrei eingespült, kann aber wegen Deformierung und Substanzerlust nicht mit Filterpapier auf denselben Feuchtigkeitszustand

wie der Träger abgepreßt werden. Der höhere Wassergehalt der Startzone macht sich meistens nach Einschalten des Stroms durch geringfügiges Abdestillieren von Wasser bemerkbar, was aber auf den Trennerfolg erfahrungsgemäß ohne Einfluß ist. Nach den geschilderten Vorbereitungen werden die ⁸⁰Cellophan-Zungen auf die Trägerschichtenden aufgelegt; dann wird die Anordnung mit einer Glasplatte bedeckt und eingeschaltet. Wir arbeiten meist mit etwa 25 V/cm Feldstärke.

Trägerstoffe

Wir haben verschiedene Pulver mit Hämoglobin als Testsubstanz auf ihre Eignung als Trägerstoffe untersucht. Benutzt wurde eine Versuchslösung von 20 mg Rinderhämoglobin in 2,5 cm³ Puffer vom pH 8,6, die mit 2 bis 3 g des zu untersuchenden Pulvers zum Brei angeteigt wurde.

Auf Cellulose-Pulver (Whatman, Solka Floc, Schleicher und Schüll, Ederol u. a.) verbreitert sich während der elektrophoretischen Wanderung die ursprünglich nur 0,5 cm breite Startzone bald so stark, daß bei mehreren Komponenten eine scharfe Trennung nicht erwartet werden kann. Das gilt auch für solche Cellulose-Pulver, die auf verschiedene Weise chemisch modifiziert waren. Preßt man Schichten aus diesen auf den erwünschten geringen Wassergehalt aus, so saugen sie sich bald aus beiden Elektrodengefäßen wieder so stark mit Puffer voll, daß die Hämoglobin-Bande rasch auf eine große Breite ausläuft.

Diese unerwünschte Verbreiterung beobachtet man auch, wenn Polyvinylchlorid-Mehl als Träger verwendet wird. In einer Schicht aus Polyvinyl-butyracetal tritt andererseits beim Hämoglobin in Veronal-Puffer überhaupt keine Wanderung ein, so daß auch dieses Material als ungeeignet ausgeschieden wurde. Nachteilig ist auch die sehr geringe Benetzbarekeit synthetischer Kunststoffe durch die wäßrigen Puffer.

Trotz der adsorptiven Eigenschaften griffen wir deshalb wieder auf die Stärke zurück. In früheren Versuchen hatte sich hier „lösliche“ Stärke, DAB 6 der Firma Merck, als beste herausgestellt. Dieses Präparat, das sich in der Hitze gut in Wasser löst, zeigt bei 20 °C eine relativ geringe Löslichkeit neben guter Quellbarkeit, Voraussetzungen, die für unsere Zwecke erfüllt sein müssen. Durch kolorimetrische Analyse der Jod-Färbung wurde festgestellt, daß sich vom Handelspräparat bei 20 °C aus 30 g beim Aufschlämmen in 20 cm³ 0,5 proz. Kochsalzlösung und Absaugen ungefähr 25 mg im cm³ aufgelöst hatten. Diese Menge macht sich bei der Elution von Proteinen, selbst wenn diese nicht stark adsorbiert werden, störend bemerkbar. Der in der

¹⁾ Pherograph Frankfurt der Firma L. Hormuth, Inh. W. E. Vetter, Heidelberg-Wiesloch.

²⁾ Th. Wieland u. G. Pfleiderer, diese Ztschr. 67, 257 [1955].

³⁾ Th. Wieland u. G. Pfleiderer, ebenda 69, 199 [1957].

⁴⁾ Th. Wieland u. G. Pfleiderer, Biochem. Z. 329, 112 [1957].

Kälte lösliche Anteil lässt sich aber stark reduzieren, wenn man das Präparat vorher mit Puffer und viel Wasser auswäscht.

Vorschrift: 200 g lösliche Stärke werden mit 500 cm^3 0,06 m Veronal-Puffer vom p_H 8,6 angerührt und die Suspension 4 Tage unter gelegentlichem Umrühren stehen gelassen. Dann wird abgesaugt, die Stärke in 2 l destilliertem Wasser aufgeschlämmt und nach 30 min, wenn sich der größte Teil abgesetzt hat, die trübe überstehende Flüssigkeit abdekantiert. Die gleiche Extraktion wird 4 mal wiederholt. Nun wird wieder abgesaugt, der Rückstand zweimal in 0,5 l Alkohol suspendiert und abgesaugt und zum Schluß mit 0,2 l Aceton auf der Nutsche gewaschen. Nach dem Trocknen bei 50°C erhält man etwa 150 g eines rein weißen Stärkepulvers. Dieses gibt bei der gleichen Elutionsprobe wie oben nur noch 2–3 mg/cm³ an die Eluierflüssigkeit ab und ist deshalb als Träger gut geeignet.

Gestalt der Banden

Am Hämoglobin lassen sich Gestaltänderungen der aufgetragenen Streifen während des elektrophoretischen Transports gut wahrnehmen. Man findet naturgemäß eine mit der Wanderungsdauer zunehmende Verbreiterung der ursprünglich 0,5 cm breiten rotbraunen Proteinzone. Diese ist von der Zusammensetzung und der Ionenstärke des verwendeten Puffers abhängig. In Veronal-Puffer (p_H 8,6) beträgt die Verbreiterung pro Stunde etwa 100%, wobei kleinere Unterschiede in der Molarität (0,05–0,1 m) keinen merklichen Einfluß haben. In TRIS-Citratpuffer desselben p_H -Wertes beträgt sie, wie wir an Schweineherzmuskel-Milchsäuredehydrogenase feststellten, bei 0,05 m 300%, bei 0,1 m 400%.

Fertigt man nach einigen Stunden Laufzeit einen Schnitt durch die Schicht in Laufrichtung an, so kann man am Hämoglobin auch die Form der Zone innerhalb des Trägers erkennen. Dabei zeigt sich, daß in Schichtdicken von mehr als 0,5 cm das Protein in der Nähe der kühlenden Auflagefläche gegenüber den oberen Bezirken um mehrere mm bis cm zurückbleiben kann und die Zonen deshalb einen rautenartigen Querschnitt aufweisen, dessen vordere und hintere Begrenzung parabelförmig gekrümmmt sind. Dies röhrt wohl hauptsächlich davon her, daß in der Schicht von oben nach unten ein Temperaturgefälle herrscht und außerdem im oberen Teil eine höhere Feldstärke, da die leitende Verbindung zwischen Elektroden und Trägerschicht durch Auflegen der Cellophan-Zungen auf die Oberfläche hergestellt wird. Man kann der Verzerrung dadurch begegnen, daß man entweder die Stärkeschicht nicht zu dick wählt oder bei dickerer Schicht den Startgraben nicht bis auf den Grund aushebt oder die leitende Verbindung an beiden Seiten des Trägers außer mit einer aufliegenden auch mit einer unterschobenen Cellophan-Manschette herstellt. Dann lassen sich symmetrische Banden erzielen, was für die Trennung ähnlich laufender Komponenten unerlässlich ist.

Einwanderung in Glaspulver

Wie erwähnt, stellen die Blutproteine durch ihre leichte Eluierbarkeit aus der Stärkeschicht einen besonders günstigen Fall dar. Bei den für die biochemische Praxis mindestens ebenso wichtigen löslichen Enzymen aber kann häufig wegen der Adsorption nur jeweils ein Bruchteil der getrennten Komponenten wieder abgelöst werden. Es erschien aussichtsreich diese Proteine nach der Trennung elektrophoretisch in eine Schicht aus einem Material einwandern zu lassen, das sie nur geringfügig adsorbiert, aus dem sie also mit wenig Puffer oder Wasser ganz zu eluieren sind. Hierzu haben wir Pulver aus verschiedenen Kunststoffen, Quarz und Glas ausprobiert und mit einem feinen Glasgrieß (etwa 200 Maschen, z. B. Fa. Wild Bayreuth, Best.-Nr. 13/100) die besten Erfahrungen gemacht. Aus

einem Brei, der aus 10 g des Pulvers mit 2 cm³ einer Lösung von 25 mg verschiedener Milchsäuredehydrogenasen angezeigt war, ließen sich auf einer engen hohen Nutsche mit 10 cm³ Wasser über 90% der vollaktiven Enzyme herauswaschen.

Um das Glaspulver als Auffangträger anzuwenden, hebt man vor der zu gewinnenden Eiweißbande einen 0,5 bis 1 cm breiten parallelen Graben über die ganze Breite der Trägerschicht aus. Nun wird auf die Sohle dieses Grabens eine ebenso lange Cellophan-Folie gelegt und mit ihrer Kante einige mm zwischen Trägerschicht und Glaspalte in Richtung zur Startstelle geschoben. Mit dieser so fixierten Folie kleidet man Boden und Rückwand des Grabens so aus, daß die Folie die Schicht um einige mm überragt. Sodann wird die präparierte Grube mit einer möglichst wasserarmen Aufschämmung des Glaspulvers in dem zur Trennung verwendeten Puffer aufgefüllt, wobei durch Einpressen mit Filterpapier für guten Kontakt, besonders an der mit Cellophan tapezierten Hinterwand gesorgt werden muß. Schaltet man den Strom ein, so wandert die Proteinbande im Verlauf einer Zeit, die sich nach ihrer Breite und Wanderungsgeschwindigkeit richtet (2 bis 4 h) quantitativ in die Auffangzone ein und wird durch die Sperrfolie am Auswandern gehindert. Hiernach kann das Glaspulver herausgenommen und mit Puffer oder Wasser auf der Nutsche eluiert werden. Ein Auffanggraben von 1,0–1,5 cm und 0,5 cm Tiefe faßt etwa 10 g Pulver.

Denaturierungserscheinungen

Obwohl bei den zur Elution aus Glaspulver mit Milchsäuredehydrogenasen angestellten Versuchen über 90% der Enzyme wieder gewonnen werden konnten, betrug die Aktivitätsausbeute nach der Stärkeelektrophorese in Veronal-Puffer und Einwanderung in das Glaspulverbett bei denselben Enzymen in wiederholten Ansätzen nur etwas mehr als 50 Prozent. Um die Ursache für diesen Aktivitätsverlust zu finden, tränkten wir eine wie oben in die Stärkeschicht eingebrachte Glaspulverzone mit demselben Veronal-Puffer, der eine bekannte Enzymmenge enthielt und setzten dieses Depot verschiedene kurze Zeiten einem elektrischen Feld von 25 V/cm aus. Dabei ergab sich der merkwürdige Befund, daß bereits nach 5 min fast die Hälfte der Enzymaktivität nach anschließender Elution nicht mehr gefunden werden konnte. Hingegen betrug die Gesamtkonzentration an Eiweiß, gemessen mit der Biuret-Methode, über 90% der eingebrachten Substanz. Der Aktivitätsschwund vergrößert sich nicht, wenn die Einwirkung des elektrischen Felds über die mehrfache Zeitdauer fortgesetzt wird, ist aber bedeutend geringer, bei Feldstärken unter 10 V/cm. Das Ausmaß dieser „Elektrodenaturierung“ scheint sehr von der Natur der Pufferionen abzuhängen; in TRIS-Citratpuffer derselben Molarität und deselben p_H -Wertes beträgt sie bei Milchsäurehydrogenasen verschiedenen Ursprungs nur 5%, so daß sich dieses Puffersystem als besonders geeignet anbieten würde. Leider hat es den Nachteil, daß in ihm die von uns bisher untersuchten Proteine unter sehr starker Verbreiterung der Zonen wandern (s. o.). Der bisher als optimal ermittelte Veronal-Puffer bewirkt zwar beim Stromdurchgang die beschriebene partielle Inaktivierung, da aber der denaturierte Anteil eine andere Wanderungsgeschwindigkeit zu haben scheint, gelangt er beim Eluieren der in Glaspulver aufgefangenen Enzym-Zone nicht mit ins Eluat. Somit wird trotz Verlusts eines Teils der Aktivität der größere, gerettete Teil ohne den denaturierten Ballast eluiert. Bei einem Milchsäuredehydrogenase-Präparat aus Schweineherzmuskel wurden nach 5 h Elektrophorese in Veronal-Puffer (p_H 8,6; 0,06 m)

auf Stärke, Auffangen der durch Abklatsch lokalisierten Zone im Glaspulverbett und Elution mit wenig Wasser eine Aktivitätsausbeute von 55% und eine Proteinausbeute von 60% erhalten.

Es wird sich deshalb oft lohnen unter Preisgabe eines Teils der Aktivität ein Enzym von anderen Eiweißkörpern

elektrophoretisch zu trennen. In gewissen Fällen wird der weniger schädliche TRIS-Citrat-Puffer, bei dem am Ende der Stärkeelektrophorese aus dem Glaspulver 85% der Enzymaktivität wiedergewonnen wurden, oder eine weitere noch zu ermittelnde Pufferlösung angebracht sein.

Eingegangen am 22. April 1958 [A 880]

Zuschriften

TiCl₃ als Isomerisierungskatalysator

Von Doz. Dipl.-Ing. R. M I H A I L

Institut für Chemische Forschung, Bukarest

Die durch aktiviertes Aluminiumchlorid katalysierte Isomerisierung von Cyclohexan zu Methylcyclopentan ist bekannt^{1, 2}. Andere Metallhalogenide, z. B. Aluminiumbromid³), wirken ähnlich auf gesättigte Kohlenwasserstoffe. Die entspr. katalytische Aktivität der Titanhalogenide wurde durch Messung der Gleichgewichtskonversion der Isomerisierung von Cyclohexan zu Methylcyclopentan beurteilt, wobei die Arbeitsbedingungen möglichst gleich gehalten wurden. Benutzt wurden reines Cyclohexan (n_D^{20} 1,4261), wasserfreies TiCl₄ und Titantrichlorid. Letzteres wurde durch Reduktion von doppelt destilliertem TiCl₄ mit H₂ an einem warmen Wolframfaden erhalten. Parallelversuche wurden mit frisch sublimiertem Aluminiumchlorid ausgeführt.

Als Reaktionsgefäß diente ein dreihalsiger Glaskolben mit Rührwerk und Kühler.

Die Aktivität der Katalysatoren wurde sowohl in wasserfreien, als auch in wasserhaltigen Medien untersucht. Stets wurde ein molares Anfangsverhältnis Cyclohexan:Metallhalogenid = 5:1 benutzt. In wasserhaltigem Medium war das molare Verhältnis Metallhalogenid:Wasser = 40:1.

Das Gleichgewicht wurde maximal nach 3 h 40 min erreicht. Die Umwandlung wurde auf Grund einer Eichkurve berechnet, die die Änderung der Brechungsindizes in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Gemisches Cyclohexan:Methyleclopentan (aus den reinen Komponenten gewonnen) angab.

Tabelle 1 zeigt die Untersuchungsergebnisse.

	Wasser-Gehalt	n_D^{20} bei Reaktionsende	Isomerisierung %
AlCl ₃	mit	1,4186	26,7
	ohne	1,4260	0,0
TiCl ₃	mit	1,4211	25,3
	ohne	1,4261	0,0
TiCl ₄	mit	1,4242	12,0
	ohne	1,4260	0,0

Tabelle I

TiCl₃ ist also in Gegenwart von Wasser ein Isomerisierungskatalysator praktisch gleicher Aktivität wie AlCl₃. Die Reaktion verläuft ohne Nebenreaktionen. Unter gleichen Versuchsbedingungen weist TiCl₄ eine geringere Wirksamkeit als das Titantrichlorid auf.

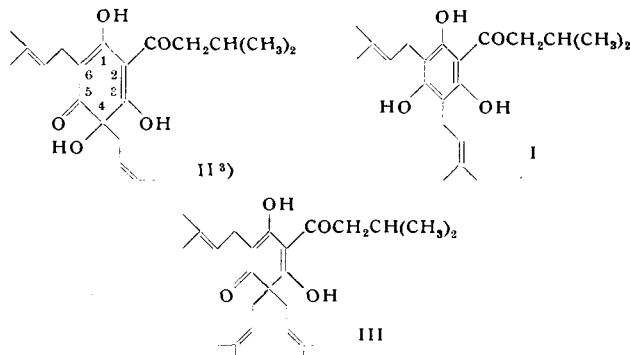
Eingegangen am 1. April 1958 [Z 611]

¹⁾ C. D. Nenitzescu u. I. P. Cantuniari, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 1097 [1933]. — ²⁾ C. D. Nenitzescu, M. Avram u. E. Siam, Bull. Soc. chim. France 1955, 1266. — ³⁾ H. Pines u. R. C. Wacker, J. Amer. chem. Soc. 68, 595 [1946].

4-Desoxy-humulon, ein neuer Hopfenbitterstoff¹⁾

Von Priv.-Doz. Dr. W. R I E D L und Dipl.-Chem. H. H Ü B N E R
Organisch-Chemisches Institut der T. H. München

Kürzlich gelang uns die Reindarstellung des sehr luft- und temperatur-empfindlichen 4-Desoxy-humulons (I) (Fp 81–82 °C)²). I interessiert als Zwischenprodukt der Humulon-Synthese, vor allem aber als der, möglicherweise gemeinsame, biosynthetische Vorfänger²) der Hopfenbitterstoffe Humulon (II)³) und Lupulon (III). Nach genauer Kenntnis der Eigenschaften bzw. Abtrennmöglichkeiten²) konnten wir nun 4-Desoxy-humulon aus der Pflanze isolieren (Hallertauer Hopfen Ernte 1957; Ausb. 0,2%, d. h. ca. 0,5% des Humulon-Gehalts). Der Naturstoff (Fp 81–82 °C; C₂₁H₃₀O₄; Misch-Fp. mit synthet. I 81–83 °C) zeigt alle Eigenschaften des synthetischen 4-Desoxyhumulons, dürfte aber gewisse Mengen 4-Desoxy-co- und 4-Desoxy-ad-humulon enthalten



(Isobutyryl- bzw. Methyläthylacetyl an Stelle der Isovaleryl-Reste). I schmeckt bitter, im Laufe des Brauprozesses wird es aber die Oxydation zu II erleiden. Auch bei allen Brauwerts-Bestimmungen des Hopfens nach der Bleiacetat-Methode („Wöllmer-Verfahren“⁴) manifestiert sich I als Humulon (II). Diese Oxydationsempfindlichkeit ist der Grund für die späte Entdeckung.

Das Auftreten des 4-Desoxy-humulons im Hopfen macht es wahrscheinlich, daß in der Pflanze zuerst das Phloroglucin-System gebildet wird und nachträglich⁵) die Prenylierungen folgen.

Eingegangen am 17. April 1958 [Z 619]

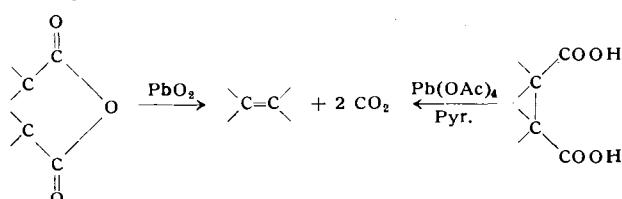
¹⁾ XIII. Mitt. Hopfenbitterstoffe; XII. Mitt. s. ²⁾; vgl. diese Ztschr. 69, 723 [1957]. — ²⁾ W. Riedl u. H. Hübler, Chem. Ber. 90, 2870 [1957]. — ³⁾ Numerierung der Ring-C-Atome nach H. Wieland u. Mitarb., Ber. dtsch. chem. Ges. 59, 2352 [1926]. — ⁴⁾ W. Riedl, Chem. Ber. 85, 692 [1952]. — ⁵⁾ Vgl. A. J. Birch in: Perspectives in Organic Chemistry; Interscience Publ. Ltd., London 1956, S. 152.

Oxydative Bisdecarboxylierung von 1,2-Dicarbonsäuren mit Bleitetraacetat

Von Prof. C. A. G R O B, Dr. M. O H T A
und A N D R E A S W E I S S

Organisch-chemisches Institut der Universität Basel

Vor einiger Zeit haben Doering und Mitarbeiter eine Methode zur oxydative Bisdecarboxylierung von 1,2-Dicarbonsäuren bzw. deren Anhydriden zu Olefinen mittels Bleidioxyds gefunden¹). Leider lassen die Ausbeuten (ca. 25%), welche noch von der Beschaffenheit des verwendeten Bleidioxyds abhängen²), zu wünschen übrig. Zudem stellen die erforderlichen Temperaturen von 150 °C und mehr die Brauchbarkeit des Verfahrens in vielen Fällen in Frage.



Wir haben deshalb Lösungen verschiedener 1,2-Dicarbonsäuren in Benzol oder Acetonitril mit einem Moläquivalent Bleitetraacetat behandelt und dabei festgestellt, daß Decarboxylierung bereits unterhalb 50 °C einsetzt, wenn ein bis zwei Moläquivalente einer Base zugesetzt werden. Als solche haben sich Pyridin und Trialkylamine bewährt. Unter diesen Bedingungen werden die gebildeten Olefine nicht in erheblichem Ausmaße durch Bleitetraacetat angegriffen und können im Falle der cis-Dicarbonsäuren I, II und III in Ausbeuten zwischen 50 und 70 % der Theorie isoliert werden. Die Reaktion gelingt ebenfalls bei der trans-Form von II, allerdings in etwas geringerer Ausbeute.