

MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNGEN DURCH POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE UNTER VERWENDUNG EINES LINEAREN GELGRADIENTEN

G. KOPPERSCHLÄGER, W. DIEZEL, B. BIERWAGEN und E. HOFMANN

Physiologisch-chemisches Institut der Karl-Marx-Universität, Leipzig, DDR

Eingegangen am 4. August 1969

A new method for molecular weight determination using polyacrylamidegel electrophoresis in a linear gel-concentration-gradient (3–20%) is described. Plotting the log of molecular weights of several standard proteins against distance of migration or against 3 log of rate of migration reveal linear relationships in ranges of 50.000 - 200.000 or 100.000 - 400.000 Daltons respectively. On this basis, a simple method for molecular weight determination of proteins (accuracy $\pm 5\%$) has been devised. The method can also be applied for an individual protein in protein mixtures using specific staining procedures.

1. Einleitung

Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Polyacrylamid-(PAA)-Gelelektrophorese sind mehrfach beschrieben worden [1–4]. Die Untersuchungen von Zwaan [1] zeigten, daß zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und dem Beweglichkeitsquotienten (Verhältnis der Beweglichkeit in zwei Gelen unterschiedlicher Konzentration) eine lineare Beziehung für einige globuläre Proteine besteht. Nach Shapiro et al. [2] ist die relative Wanderungsstrecke von Na-Dodecylsulfat-Proteinkomplexen in 5%igem PAA-Gel ebenfalls dem Logarithmus des Molekulargewichtes proportional. Da diese Beziehungen hauptsächlich auf der Molekülsiebwirkung des PAA-Gels beruhen, war es interessant, die elektrophoretische Mobilität globulärer Proteine in einem kontinuierlichen PAA-Gelgradienten zu studieren. Über den Vorteil der Disk-Elektrophorese bei Anwendung eines Gelgradienten haben verschiedene Autoren berichtet [5–7].

2. Material und Methoden

Die Materialien stammten von: Cyanogum 41 und Dimethylaminopropionitril, Serva, Heidelberg; Katalase, Hexokinase, Lactatdehydrogenase,

Boehringer & Söhne, Mannheim; Rinderserumalbumin, Eier-Albumin, Forschungsinstitut für Impfstoffe, Dessau; Apoferritin, Mann-Research; Leucinaminopeptidase aus Rinderaugenlinsen stammte vom Physiologisch-chemischen Institut der Universität Halle, Carnitindehydrogenase aus der Abteilung Biochemie der Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig.*

Der Acrylamidkonzentrationsgradient wurde mit einem Gradientenmischer nach den Angaben von Martin und Ames [8] hergestellt. Die Lösungen I und II enthielten folgende Komponenten: Lösung I: Tris-HCl-Puffer 0,35 M, pH 8,9, Cyanogum 41 20%, Saccharose 10%, $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,01%, Ammoniumpersulfat 0,03%, Dimethylaminopropionitril 0,3%. Lösung II: Tris-HCl-Puffer 0,35 M, pH 8,9, Cyanogum 41 3%, $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,005%, Ammoniumpersulfat 0,03%, Dimethylaminopropionitril 0,3%. Beide Lösungen wurden vor Einfüllen in den Gradientenmischer auf 0° C gekühlt. Der Gradient wurde in Glasröhrchen von 10 cm Länge und 0,4 cm Durchmesser innerhalb von 10 min gegossen und danach mit wenig Wasser überschichtet.

Aufgrund des $K_3[Fe(CN)_6]$ -Gradienten setzte die Polymerisation von oben nach unten ein.

* Wir danken Dr. Kretschmer, Halle, und Prof. Aurich, Leipzig, für die Überlassung der Enzyme.

3. Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt die Abhängigkeit des Molekulargewichtes zahlreicher Proteine von der Länge ihrer Wanderungsstrecke im linearen Gelkonzentrationsgradienten (3–20%). Für die Auftragung wurden 2 Funktionen gewählt:

$$MG = K \frac{1}{x^3}, \quad (I)$$

$$MG = K' \frac{1}{e^x}; \quad (II)$$

x = Wanderungsstrecke des Proteins im Gel.
Nach Untersuchungen von Tombs [10] erfüllt eine analoge Gleichung wie (I) die experimentellen Befunde hinreichend, wenn das Verhältnis der Wanderungsgeschwindigkeiten in einem Gel bestimmter Konzentration und bei freier Elektrophorese (Gelkonzentration = 0) gleich 0,5 ist. Es wird angenommen, daß die Wanderungsstrecke eines Proteins im linearen Gelgradienten eine analog definierbare Größe wie die von Tombs [10] in Gleichung [10] definierte Konzentration c ist, sofern das Verhältnis der Geschwindigkeiten nicht überschritten wird. Die Abb. 1 zeigt, daß im Bereich von 100 – 500.000 diese Linearität auch dann gilt, wenn der Quotient aus den Beweglichkeiten im Gel und bei freier Beweglichkeit unter gleichen Bedingungen wesentlich kleinere Werte als 0,5 annehmen kann, denn bei Verwendung eines Gelgradienten wird die Beweglichkeit des Proteins im Gel zunehmend kleiner. Lediglich bei Molekulargewichten unter 100.000 können Abweichungen von dieser linearen Beziehung auftreten. Für die Erklärung dieses Verhaltens wird angenommen, daß sehr kleine Proteinmoleküle aufgrund längerer Wanderungsstrecken und reziproker Abhängigkeit der Porengröße von der Gelkonzentration [10] unter den gewählten Bedingungen wesentlich langsamer ein Porenvolumen erreichen, das dem Molekulargewicht des Proteins entspricht. Wählt man jedoch eine exponentielle Auftragung nach Gleichung (II), so zeigt sich selbst bei kurzen Elektrophoresezeiten eine sehr gute lineare Beziehung zwischen Wanderungsstrecke und dem Logarithmus des Molekulargewichtes im unteren Molekulargewichtsbereich. Bei Molekulargewichten über 200.000 treten größere Abweichungen auf.

Durch die Wahl beider graphischer Verfahren ist es möglich, mit Hilfe von Eichkurven Molekulargewichte

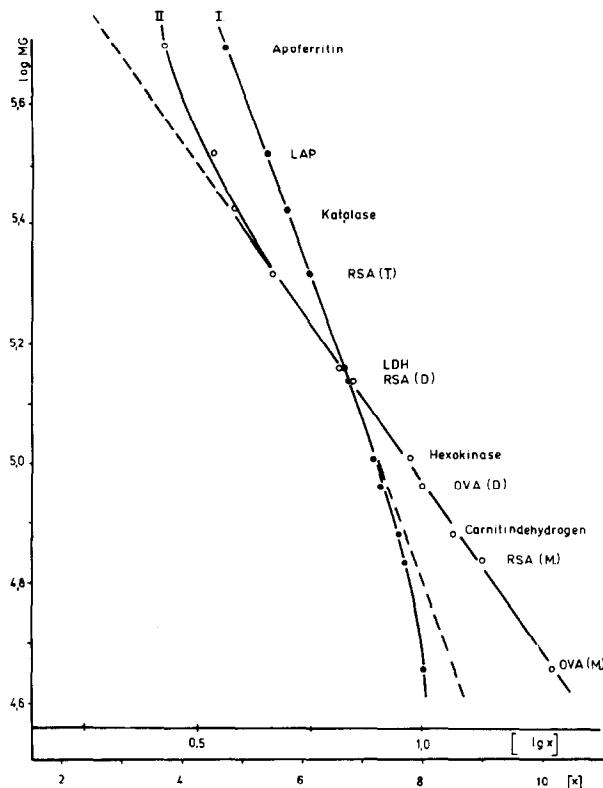


Abb. 1. Beziehung zwischen Logarithmus des Molekulargewichtes von Proteinen und deren Wanderungsabschnitt im Gelgradienten. Exp. Bedingungen siehe "Material und Methoden". Kurve I: Logarithmische Darstellung nach Gleichung (I); Laufzeit 6 Std. bei 300 V; Kurve II: Logarithmische Darstellung nach Gleichung (II); Laufzeit 3 Std. bei 200 V, x = Wanderungsabschnitt des Proteins.

Dadurch wurde eine Konvektionsstörung infolge auftretender Polymerisationswärme verhindert. 30 – 50 μ g Protein wurden mit einer 40%igen Saccharose-lösung verdünnt und zwischen Elektrodenpuffer und dem oberen Gelende eingebracht. Der Elektrodenpuffer enthielt 0,06 M Tris und 0,4 Glycin, pH 8,3. Die Elektrophorese wurde bei 200 bzw. 300 V, 4–6 mA pro Röhrchen und Zimmertemperatur durchgeführt und entweder beendet, wenn die Pufferfront (Bromphenolblau) das Ende des Glasröhrchens erreicht hatte, oder nach einer Verlängerung um die gleiche Zeit. Anschließend wurde mit 12%iger Trichloressigsäure fixiert und nach Angaben von [9] mit Coomassie Brillant Blau gefärbt.

Tabelle 1
Vergleich der Molekulargewichte einiger Proteine mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode.

Protein	Molekulargewicht (Literatur)	Molekulargewicht (dieser Arbeit)	Färbung
Lactat-dehydrogenase	142.000 [11]	135.000	enzymatisch*
Hexokinase	95.000 [12]	105.000 \pm 4.000	enzymatisch**
Katalase	240.000 [13]	248.000 \pm 13.000	Coomassie [9]
Carnitin-dehydrogenase	75.000 [14]	80.000 \pm 3.000	enzymatisch***
Leucinamino-peptidase	326.000 [15]	302.000 \pm 6.000	Coomassie [9]

Enzymatische Färbung: Reduktion von 2-(p-Nitrophenyl)-3-(p-jodphenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid durch NADH₂ bzw. NADPH₂ in einfacher oder gekoppelter enzymatischer Reaktion. * nach [18] mittels Lactat und NAD als Substrate, ** nach [17] mittels Glucose, ATP und NADP als Substrate, *** Oxydation des L-Carnitins mittels NAD.

unbekannter Proteine durch Bestimmung ihres Wanderungsabschnittes im Bereich von 40.000 bis etwa 400.000 mit einer Fehlerbreite von \pm 5% zu bestimmen. In Tabelle 1 sind die Molekulargewichte einiger bekannter Proteine mit den nach dieser Methode experimentell ermittelten Werten verglichen. Als Eichproteine dienten Ovalbumin, Rinderserumalbumin (Mono-, Di-, Trimer) und Apoferritin.

Um einen evtl. Einfluß der Ladung der Proteine auf ihren jeweiligen Wanderungsabschnitt zu erkennen, wurden Elektrophoresen bei pH 8,0 und 9,5 durchgeführt. In beiden Fällen wurden jedoch lineare Beziehungen nach den angegebenen Gleichungen (I) und (II) erhalten. Es ist deshalb auch möglich, die Wanderungsgeschwindigkeiten von Enzymen bei nur partieller Reinigung zu ermitteln, wenn es gelingt, diese durch eine spezifisch enzymatische Färbung nachzuweisen (Tabelle 1).

Die beschriebene Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen beruht auf der Annahme, daß zwischen der Wanderungstrecke eines Proteins, dessen Volumen und der Größe des Porenvolumens im PAA-Gel eine proportionale Beziehung existiert. Für die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von der Molekülgröße im Gel haben alle Einschränkungen Gültigkeit, die für die Bestimmung des Molekulargewichtes mit Hilfe der Sephadex-Gelchromatographie gemacht werden [16], mit dem Unterschied, daß die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteinmoleküls im Gelgradienten mit Zunahme des

Reibungswiderstandes kleiner wird. Dadurch wird die zu Beginn der Elektrophorese infolge der Ladungsunterschiede der Proteine unterschiedliche Beweglichkeit überlagert, so daß die Proteine vornehmlich entsprechend ihrer Molekülgröße wandern. Nach der von Tombs [10] angegebenen Beziehung zwischen der Konzentration des Gels und dem Porenvolumen existiert bei einem Gelgradienten für jede Molekülgröße eines Proteins ein Porenvolumen, bei dem seine Wanderungsgeschwindigkeit sehr klein wird und bei langen Laufzeiten gegen Null limitiert. Somit entsprechen die Positionen der Proteinbanden im Gel weitgehend ihren molekularen Dimensionen und damit ihren Molekulargewichten, wenn man die Unterschiede in der Moleküldichte vernachlässigt.

Ein wesentlicher Vorteil der Molekulargewichtsbestimmung durch die Gradienten-Diskelektrophorese gegenüber der Sephadex-Gelchromatographie liegt im Einsatz kleiner Proteinmengen (20–40 γ) und der relativ kurzen Versuchsdauer von 3–4 Stunden. Das Verfahren versagt bei Proteinen, die infolge der Konzentrierung der Banden zu Beginn der Elektrophorese aggregieren. Einen solchen Effekt haben wir bei Pyruvatkinase und Aldolase beobachtet.

Literaturverzeichnis

- [1] J.Zwaan, *Analyt. Biochem.* 21 (1967) 155.

- [2] A.L.Shapiro, E.Viñuela und J.V.Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 815.
- [3] J.L.Hedrik und A.J.Smith, *Arch. Biochem. Biophys.* 126 (1968) 155.
- [4] W.Thorun und E.Mehl, *Biochim. Biophys. Acta* 160 (1968) 132.
- [5] J.Margolis und K.G.Kenrick, *Nature* 214 (1967) 1334.
- [6] G.G.Slater, *Analyt. Biochem.* 24 (1968) 215.
- [7] E.Epstein, Y.Houvras und B.Zak, *Clin. Chim. Acta* 20 (1968) 335.
- [8] R.G.Martin und B.N.Ames, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1372.
- [9] A.Chrambach, *Analyt. Biochem.* 15 (1966) 544.
- [10] M.P.Tombs, *Analyt. Biochem.* 13 (1965) 121.
- [11] R.Jaenicke und S.Knof, *European J. Biochem.* 4 (1968) 157.
- [12] U.W.Kenkare und S.P.Colowick, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 4570.
- [13] H.Sund, K.Weber und E.Mölbart, *European J. Biochem.* 1 (1967) 400.
- [14] Persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Aurich, Leipzig.
- [15] K.Kretschmer und H.Hanson, *Z. Physiol. Chem.* 349 (1968) 831.
- [16] P.Andrews, *Biochem. J.* 96 (1965) 595.
- [17] G.Kopperschlager und E.Hofmann, *Z. med. Labortechn.* 10, im Druck.
- [18] M.Knedel, K.Eberhard und H.Kirzeder, *G-I-T-Fachz. Lab.* 10 (1966) 631.