

CHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON TRYPSIN

G. KRAMPITZ UND F. KNAPPEN

Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere, Universität Bonn (Deutschland)*

(Eingegangen den 30. Juni 1960)

Über die Trennung und Reinigung von Proteinen insbesondere von Enzymen mittels chromatographischer Methoden ist bereits mehrfach berichtet worden¹⁻¹³.

Wir verwendeten zur chromatographischen Isolierung und Reinigung von Trypsin aus handelsüblichen Präparaten und Pancreasextrakten als stationäre Phase CAM-Pulver (Schleicher und Schüll), einen Kationenaustauscher auf Cellulosebasis. Das CAM-Pulver wurde in 0,2 N Na-Phosphatlösung, pH 6,8¹⁴, aufgeschlämmt und ohne weitere Vorbehandlung in die chromatographischen Kolonnen eingefüllt. Es wurden für analytische Untersuchungen Säulen von 15 × 0,9 cm verwendet. Der beste Trenneffekt konnte mit der genannten Pufferlösung erreicht werden, nachdem mit anderen Eluierungsmitteln mit pH-Werten zwischen pH 4,25 und 9,00 keine Adsorption erreicht werden konnte, die bei einer nachfolgenden Eluierung eine geeignete Trennung der einzelnen Komponenten gewährleisten hätte. Die Durchfluggeschwindigkeit der Pufferlösungen ist auf 10 ml/h bemessen worden. Die Chromatographie erfolgte bei Raumtemperatur. Der Nachweis der getrennten Substanzen er-

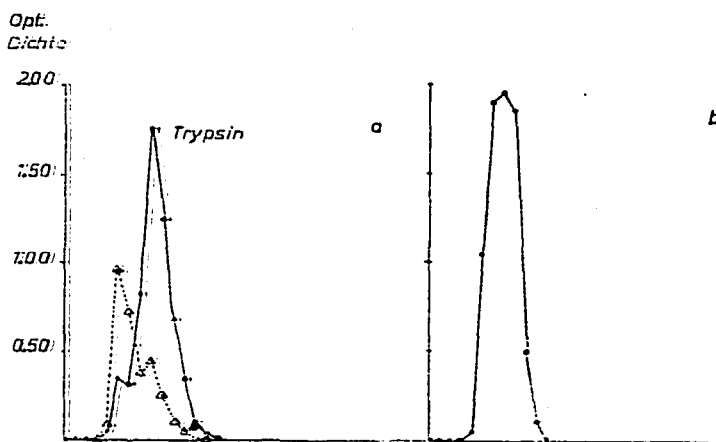


Fig. 1. Chromatographische Trennung von Trypsin an 15 × 0,9 cm CAM-Säulen im analytischen Maßstab. (a) ●—● Verlauf der Elution von Trypsin (Merck), der mit "Trypsin" bezeichnete Gipfel enthält Trypsinaktivität; △—△ Chromatogramm von Pancreatin (Merck). Elutionsmittel: 0,2 N Na-Phosphatlösung, pH 6,8. Volumen der Eluatfraktionen: 2 ml. (b) Chromatogramm vom Trypsin (Merck). Elutionsmittel: 0,2 N Na-Citratlösung, pH 4,25. Volumen der Eluatfraktionen: 2 ml.

* Direktor: Prof. Dr. E. SCHÜRMAN.

folgte mit Hilfe eines modifizierten Ninhydrin-Reagenzes¹⁵. Die für die analytischen Arbeiten verwendeten Mengen an Trypsin-Präparaten (10 mg Protein) sind in der Pufferlösung pH 6.8 auf die Säulen aufgetragen worden.

Die Ergebnisse der Chromatographie von trypsinhaltigen Präparaten im *analytischen Masstab* sind in Fig. 1 dargestellt.

Zur Trennung und Reinigung von trypsinhaltigen Präparaten (Trypsin (Merck), Pancreatin (Merck) sowie Pancreatin (Schwab)) im *präparativen Rahmen* verwendetem wir CAM-Säulen von 15 cm Länge und Durchmesser von 2 cm. Die Kolonnen sind ebenfalls mit dem Puffer pH 6.8 äquilibriert worden. Die je Analyse auf die Säulen aufzutragenden Mengen sind auf 100–200 mg Protein bemessen worden. Das aus den Säulen austretende Eluat wurde in Portionen von 5 ml aufgefangen; ein aliquoter Teil jeder Eluatfraktion ist nach der Ninhydrin-Methode analysiert worden. Nur der in der Fig. 2 als "Trypsin" bezeichnete Gipfel besass Trypsin-Aktivität.

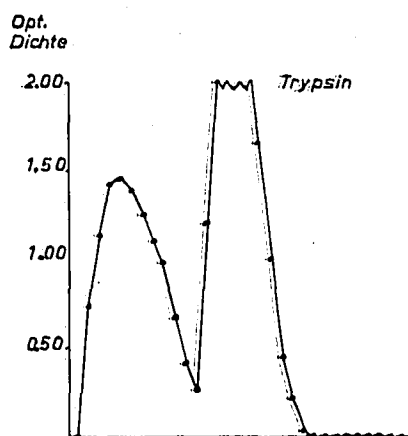


Fig. 2. Chromatographische Reinigung von Trypsin an 15×2 cm CAM-Säulen. Nur der als "Trypsin" bezeichnete Gipfel enthielt Trypsinaktivität. Elutionsmittel: 0.2 N Na-Phosphatlösung pH 6.8. Volumen der Eluatfraktionen: 5 ml.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur Chromatographie von Trypsin an Cellulose-Austauschern (CAM) für analytische und präparative Zwecke beschrieben.

SUMMARY

A method for the chromatography of trypsin on cellulose-exchangers ((CAM)) for analytical and preparative work is described.

LITERATUR

- ¹ C. H. W. HIRS, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 5743.
- ² C. H. W. HIRS, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 93.
- ³ S. PALEUS UND J. B. NEILANDS, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 1024.
- ⁴ N. K. BOARDMAN UND S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 171 (1953) 208.
- ⁵ E. MARGOLIASH, *Biochem. J.*, 56 (1954) 529.

- ⁶ H. H. TALLAN UND W. H. STEIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 2976.
- ⁷ H. H. TALLAN UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 507.
- ⁸ C. H. W. HIRS, W. H. STEIN UND S. MOORE, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1893.
- ⁹ C. H. W. HIRS, S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 493.
- ¹⁰ H. A. SOBER, F. J. GUTTER, M. M. WICKOFF UND E. A. PETERSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 756.
- ¹¹ R. R. PORTER, *Biochem. J.*, 53 (1953) 320.
- ¹² S. MOORE UND W. H. STEIN, *Advances in Protein Chem.*, 11 (1956) 191.
- ¹³ S. E. G. AQUIST UND C. B. ANFENSEN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1112.
- ¹⁴ S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 152 (1951) 663.
- ¹⁵ R. MÜLLER UND G. KRAMPITZ, *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk.*, 11 (1956) 227.

J. Chromatog., 5 (1961) 174-176