

## Rasche Fingerprint-Entwicklung auf Kieselgel-Dünnschichtplatten

Die Trennung von Peptidgemischen nach dem Fingerprint-Verfahren auf Kieselgel-, Sephadex-, oder Cellulose-Dünnschichtplatten<sup>1-7</sup> weist gegenüber der Analyse auf Papierbögen grössere Trennschärfe auf und verläuft rascher. Für die präparative Isolierung einzelner Peptide bietet sie den Vorteil von aminosäurefreien Trägern. Zur Auftrennung vielfältiger Peptidgemische kommen grössere Platten von 1000-1500 cm<sup>2</sup> zur Anwendung. Hier benötigt die Kombination der Elektrophorese und Chromatographie zumindest 6-8 Stunden. Um Serien von Eluatfraktionen der Säulenchromatographie von Peptiden rasch untersuchen und präparativ aufarbeiten zu können, elektrophoresierten wir auf 35 × 42 cm grossen Kieselgel-Dünnschichtplatten während 20 min in einem gekühlten Benzinbad und entwickelten in der zweiten Dimension während etwa 90 min mit der seltener angewandten absteigenden Chromatographie. Der Fingerprint ist so nach 2 Stunden beendet, kleinere Platten der üblichen Grösse von 20 × 20 cm lassen sich in 45-60 min entwickeln. Es zeigte sich, dass die Steigerung der Elektrophoreseschwindigkeit die Trennschärfe erhöhte, während zu rasche Chromatographie Flecken mit Streifenbildung ergab.

0.3 cm dicke Glasplatten wurden mit Kieselgel (Merck, unter 0.08 mm zusatzfrei, da Zusätze die Trennschärfe verschlechterten) mit einem Streichhobel nach dem STAHL'schen Prinzip<sup>8</sup> 0.3 mm dick beschichtet und luftgetrocknet. Bei einigen Peptidgemischen, die schwerlösliches Material am Start zurückliessen, prägten sich die Flecken schärfer aus, wenn an der Auftragstelle ein leicht befeuchtetes Scheibchen Chromatographiepapier angebracht wurde. Dies vermied auch das gelegentliche Abbröckeln der Dünnschicht an der Auftragstelle bei vielfältigem Aufbringen verdünnter Peptidlösungen.

Zur Elektrophorese diente ein stufenlos regelbares Gerät von 550 mA und 12000 V Leistung. Die Platten lagen in einer 47 cm langen, 47 cm breiten und 13 cm hohen Kammer aus Trovidur auf Querleisten, deren zwei die Pufferbehälter abgrenzten (Fig. 1). Im Abstand von 0.8 cm über der Platte hing an der Unterseite des Deckels eine Kühlschleife aus PVC-Schlauch, 0.4 cm i.D. (Kautex-Werke, Köln, lösungsmittelfest). Den Kontakt mit den beiden Pufferabteilungen bildeten Streifen aus Leinentuch; nach dem Eintauchen in den Puffer hafteten sie, etwa 1 cm breit am Rand der Dünnschicht leicht aufgestrichen, gut an. Die Elektroden bestanden aus T-förmig verschweissten und mit Dialysenschlauch überzogenen Polypropylenrohren (Fig. 1), gefüllt mit der Pufferlösung. Als Badflüssigkeit diente Petroläther (Kp. 120-150°), die Kühlschleife wurde mit Isopropanol von 0° durchströmt.

Vor der Elektrophorese wurden die Platten mit Pufferlösung (Pyridin-Eisessig-Wasser, 100:6:894) bis zu beginnendem feuchten Glanz besprüht. Die Peptide wanderten während 20 min bei 500 mA und etwa 2-3000 V, bei den kleineren Standardplatten während 12 min bei 250 mA und 2000 V. Häufig wurde das Peptidgemisch strichförmig über 30 cm Breite aufgetragen. Hierzu diente eine dickwandige Kapillare, die am unteren Ende durch Abschleifen sorgfältig abgerundet und oben mit einem kugelförmigen Reservoir versehen war. Sie wurde mit einem Führungsbrett aus Kunststoff entlang einer wenige cm über der Schicht gelagerten Glasplatte gleichmässig fortbewegt. Nach kurzem Kontakt mit der Schicht am Anfangspunkt bildete sich eine kleine Flüssigkeitssäule zur Kapillare aus, die ohne weitere Berührung einen 0.8 cm breiten Auftragsstrich entstehen liess. Eine Fraktion tryptischer Peptide aus

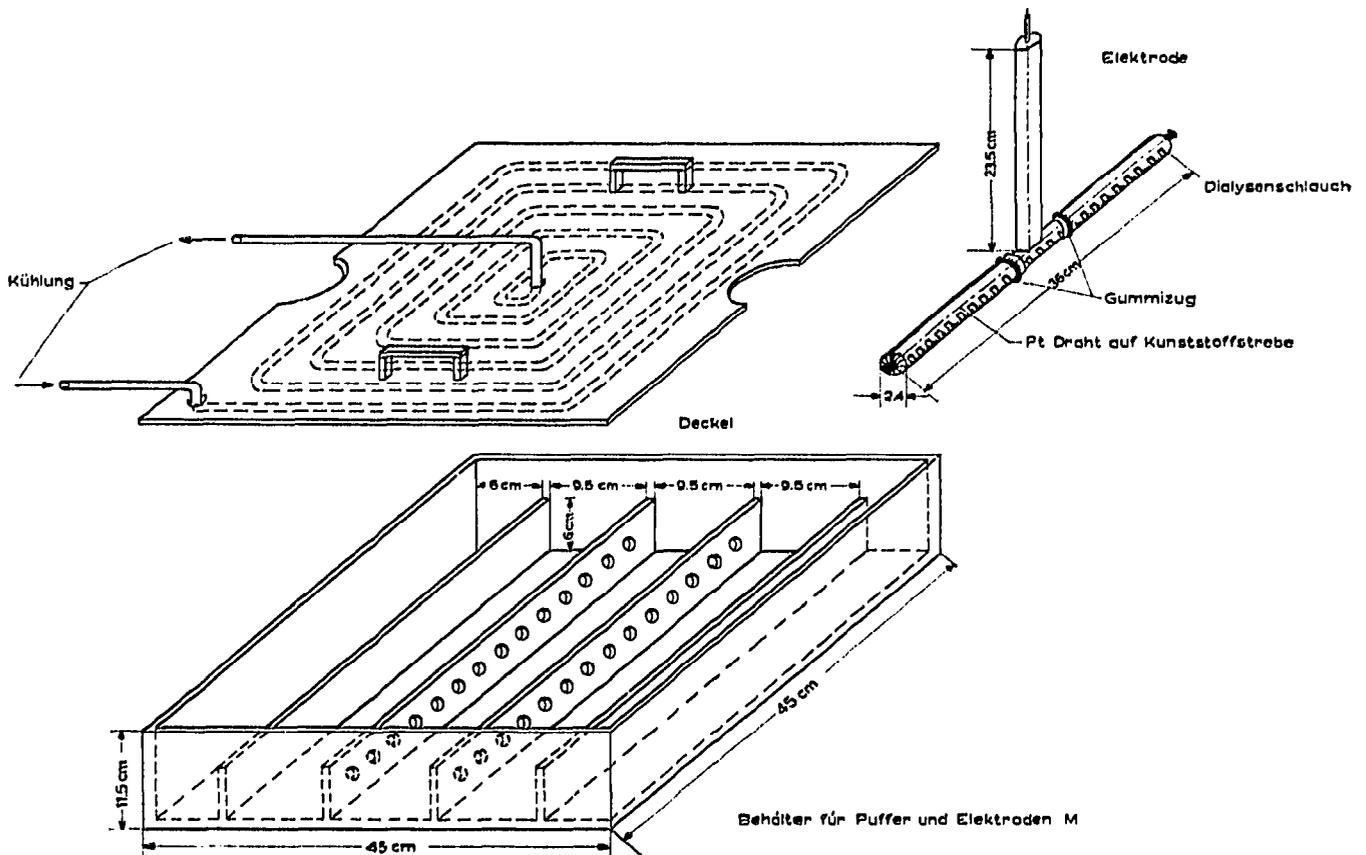


Fig. 1. Elektrophoresekammer für Dünnschichtplatten.

H-Meromyosin zeigte bei der beschriebenen Wanderungsgeschwindigkeit Banden von 0.2–0.9 cm Breite, bei langsamerer Elektrophorese in doppelter, beziehungsweise dreifacher Zeit verbreiterten sich die Zonen auf 0.4–1.2 und 0.4–1.8 cm im Durchschnitt.

Nach dem Trocknen in einem mit Ventilator versehenen Trockenschrank bei 60° wurden die Fingerprint-Platten in Glaskästen von 55 cm Höhe, 45 cm Länge und 20 cm Breite für 2 Platten mit silikonabgedichtetem Deckel eingestellt. Die besten Trennungen ergab stets das nach WIELAND *et al.*<sup>3</sup> modifizierte Gemisch Methanol-Chloroform–34% Ammoniak (40:40:15) mit NH<sub>3</sub>-Gas gesättigt. Auch Methyläthylketon-Pyridin-Wasser (70:15:8) und Butanol-Eisessig-Wasser-Pyridin (30:6:10:20) erzielten gute Resultate. Da die Gemische viele Kunststoffe und Kittsubstanzen angreifen, wurde der Lösungsmitteltrog (4 cm breit, 2.5 cm tief, halbkreisförmig) auf ein dreibeiniges Gestell aus Glasstäben mit entsprechend gebogenen Verbindungsstäben aufgesetzt. Zur Verbrückung mit den Dünnschichtplatten dienten 32 cm breite und ca. 16 cm lange Streifen aus Karton-Filterpapier (für die kontinuierliche Elektrophorese, Fa. Macherey und Nagel). Sie wurden vor dem Anlegen in das Gemisch getaucht und mit einem 2 cm breiten und 1 cm dicken Kunststoffstab über die ganze Breite der Platte angepresst; an den Seiten war er mit Klammern an der Platte befestigt. Eine Glasschale am Boden der Kammer, gefüllt mit dem Chromatographiegemisch, erhielt die sehr wichtige Zusammensetzung der Atmosphäre aufrecht. Durch die Länge der Papierbrücke zum Lösungsmitteltrog liess sich die Geschwindigkeit der Chromatographie regulieren. Bei anfänglichen Wanderungsgeschwindigkeiten von

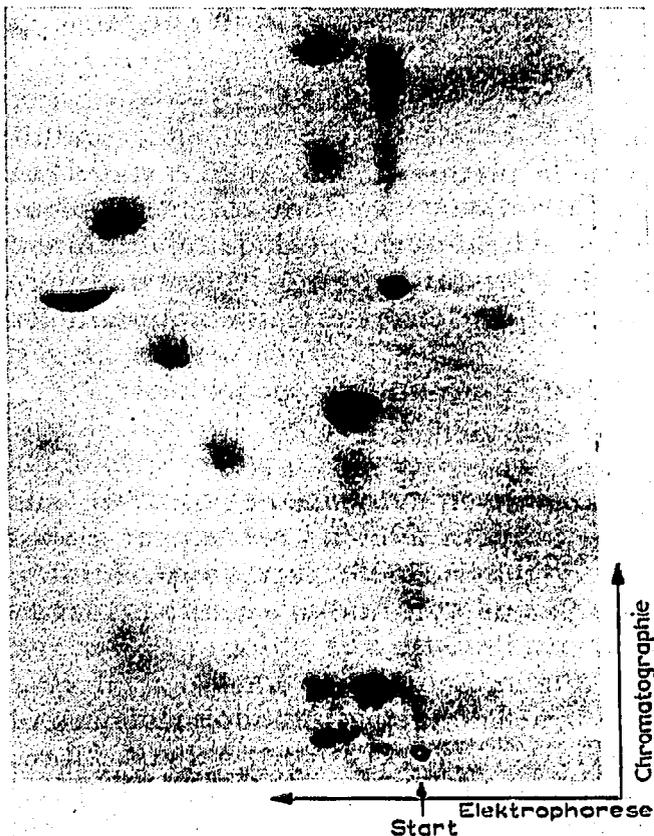


Fig. 2. Trennung tryptischer Peptide aus Walmyoglobin auf einer  $42 \times 35$  cm grossen Dünnschichtplatte während zwei Stunden. Der Fingerprint wurde nach BRENNER *et al.*<sup>8</sup> angefärbt, jedoch unter Ausschluss von Licht, um einen hellen Untergrund zu erhalten. Im Durchlicht fotografiert.

mehr als 5 cm in 20 min wanderten die Peptide als längliche Streifen. Bei der Entwicklungsdauer von 90 min für grosse und 30 min für Standardplatten war eine optimale Trennung erreicht (Fig. 2). Gegen Ende der Chromatographie steigt die Wandergeschwindigkeit des Lösungsmittels beträchtlich an.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Würzburg,  
(Deutschland)

HANS-PETER NAST  
HUGO FASOLD\*, \*\*

- 1 TH. WIELAND UND D. GEORGOPOULOS, *Biochem. Z.*, 340 (1964) 476.
- 2 TH. WIELAND, D. GEORGOPOULOS UND H. KAMPE, *Biochem. Z.*, 340 (1964) 483.
- 3 TH. WIELAND, G. LÜBEN UND H. DETERMANN, *Experientia*, 18 (1962) 430.
- 4 H. STEGEMANN UND B. LERCH, *Anal. Biochem.*, 9 (1964) 417.
- 5 W. J. RITSCHARD, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 327.
- 6 P. FASELLE, A. GIARTOSIO UND C. TURANO, in G. B. MARINI-BETTÒLO (Herausgeber), *Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1964, S. 205.
- 7 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962.
- 8 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962.

Eingegangen den 9. August 1966

\* Unter der technischen Mitarbeit von HANS FEINEIS.