

DIE CHROMATOGRAPHIE VON PROTEINEN UND NUCLEINSÄUREN AUF PAPIER UND DÜNNSCHICHTEN

KLAUSDIETER BAUER

Speyer, 15 P. Drachstr. (Deutschland)

(Eingegangen den 1. September 1967)

Die Reinigung und Fraktionierung von Proteingemischen, wie sie in der Natur vorkommen, kann mit einer ganzen Reihe von Methoden erreicht werden. Die Ausfällung von Eiweiss m.H. von Säuren und das Aussalzen gehören mit zu den älteren Verfahren. In neuerer Zeit kommen die Chromatographie an Ionenaustauschersäulen (z.B. Amberlite, DEAE- und CM-Zellulose u.v.a.)^{9,18}, die Gelfiltration (Sephadex) und die Elektrophorese, frei und an einer Vielzahl von Trägermaterialien wie Papier, Stärke- und Polyacrylamidgel und Agar bzw. Agarose hinzu^{5,13}. Dagegen tritt die Bedeutung der Papier- und Dünnschichtchromatographie für die Trennung von Proteinen in der Literatur bisher deutlich zurück, obwohl sich eine grössere Anzahl von Autoren mit ihr befasst haben. So trennten z.B. ZIMMERMANN UND KLUDAS¹⁰ in Rundfilteranordnung Serumalbumin von den Globulinen (Laufmittel: *n*-Butanol-gesättigtes Wasser/Na-Dodekansulfat, wassergesättigt/*n*-Butanol, 20:10:0.8); ebenso wurde über die erfolgreiche Fraktionierung verschiedener Insulinpräparate¹² und die Trennung von Insulin und Protamin berichtet¹⁴.

DAS GRADIENTENVERFAHREN FÜR DIE PAPIER- UND DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON PROTEINEN UND NUCLEINSÄUREN

Im folgenden wird über eine neu entwickelte Technik für die Chromatographie von Proteinen und Nucleinsäuren auf Papier verschiedener Stärke und auf Zellulose-dünn- und Dickschichtplatten berichtet. Die mit ihr erzielbaren Trennungen entsprechen im Durchschnitt etwa denen der Papierelektrophorese. Im Falle der Histone sind sie dieser überlegen⁴. Es wird eine genaue Beschreibung der Technik und eine Übersicht über alle bisher durchgeführten Fraktionierungen gegeben. Diese umfassen u.a. Serumproteine von Mensch, Kaninchen, Meerschweinchen, Hammel und Rind, Protamine, Histone aus Ratten-, Kaninchen- und Rindergeweben, drei pharmazeutische Insulinpräparate und drei kommerzielle Nucleinsäurepräparate.

Es sei erwähnt, dass auch auf Kieselgeldünnschichtplatten in einigen Fällen chromatographische Trennungen erzielt werden konnten³. Anschliessend werden einige theoretische Überlegungen über den Mechanismus der Trennung mitgeteilt.

MATERIAL UND METHODEN

Technik der Papierchromatographie

Verwendet wurde als Standardpapier der Typ Schleicher und Schüll 2043 b Mgl.

Die zu trennenden Substanzen werden mit Hilfe einer Pasteurpipette mit abgerundeter Spitze oder einer anderen vergleichbaren Pipette als Strich von Rand zu Rand des Papierbogens (ca. 10×25 cm), 2.5 cm vom unteren Ende entfernt, aufgetragen (Fig. 1). Das Auftragen als Punkt oder als nicht bis zu Rändern reichende Linie führt im allgemeinen zu einem vollständigen Fortfall des Trennungseffektes. Von den ca. 1 % Lösungen wird etwa viermal übereinander in der angegebenen Weise aufgetragen und jedes Mal im kalten Luftstrom getrocknet. Die Breite der Auftragslinie sollte 4 mm nicht überschreiten. Zwischenräume zwischen dem Ende der Startlinie und dem Papierrand oder zwischen zwei Startlinien beim vergleichenden Chromatographieren mehrerer Substanzen auf dem gleichen Bogen sind zu vermeiden.

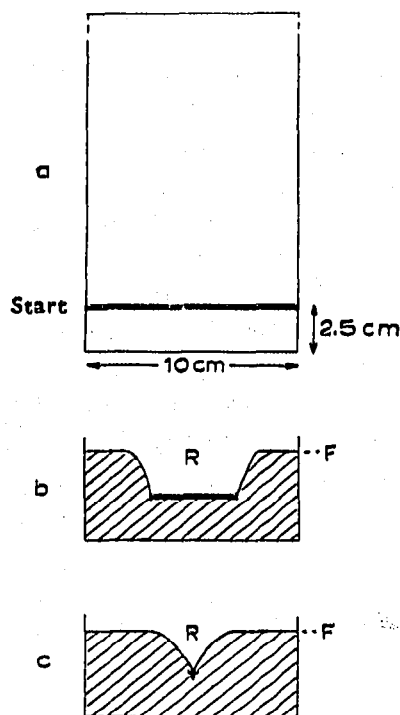


Fig. 1. Unter (a) sind Ausmasse und die Lage der Auftragslinie für unsere Chromatogramme eingezeichnet. Wird die Probe, wie unter (b), als nicht durchgehende Linie oder, wie unter (c), als Punkt aufgetragen, bildet sich eine Retentionslücke (R), durch die die Trennung bei (b) in den Fronten, bei (c) in allen Teilen des Chromatogramms sehr stark gestört wird.

TABELLE I

DIE BENUTZTEN LAUFMITTELSYSTEME (LMS)

Die Nummerierung ist eine Erweiterung der Tabelle I in Lit. 4.

LMS 1	Je 15 min HCl 1 N/0.25 N/0.1 N/0.01 N/Essigsäure 50 %
LMS 3	Je 15 min NaCl 1 M/0.25 M/0.1 M/0.01 M/H ₂ O
LMS 4	Je 15 min NaCl 1 M/0.25 M/0.1 M/0.01 M/Essigsäure 50 %
LMS 5	Je 15 min NaCl 4 M/2 M/1 M/0.1 M/0.01 M
LMS 6	Je 15 min NaCl 4 M/2 M/1 M/0.1 M/0.01 M/Essigsäure 50 %
LMS 7	Je 30 min Perchlorsäure 0.74 N/Äthanol 80%/Äthanol 96 % + HCl 1 N (4:1)
LMS 8	Je 15 min NaCl 4 M/2 M/1 M/0.1 M/0.01 M/H ₂ O
LMS 9	Je 15 min Na-Acetat 4 M/2 M/1 M/0.1 M/0.01 M/Essigsäure 50 %
LMS 10	Je 15 min Na-Acetat 4 M/2 M/1 M/0.1 M/0.01 M/H ₂ O
LMS 11	Je 15 min CsCl 1 M/0.25 M/0.1 M/0.01 M/Essigsäure 50 %
LMS 12	Je 15 min NH ₄ Cl 1 M/0.25 M/0.1 M/0.01 M/Essigsäure 50 %

In diesem Fall sollten von den verschiedenen Substanzen auch etwa gleiche Mengen aufgetragen werden, da sonst Unregelmässigkeiten der Front auftreten.

Die Entwicklung erfolgt in einem der in Tabelle I angegebenen diskontinuierlichen Laufmittelgradienten fallender Molarität. Das Chromatogramm wird in das Gefäss, das mit der ersten Entwicklungsflüssigkeit beschickt ist, eingehängt und 15 min lang aufsteigend (bei LMS 7 der Tabelle I 30 min lang) entwickelt. Dann wird das feuchte Chromatogramm sofort in die zweite Entwicklungsflüssigkeit überführt, nach weiteren 15 min in die dritte usf. Beim LMS 1 der Tabelle I z.B. erfolgt die Entwicklung zuerst 15 min lang in 1 N HCl, dann je 15 min in 0.25 N HCl, 0.1 N HCl, 0.01 N HCl und in 50 % Essigsäure. Ein völliger Abschluss des Chromatographiergefässes oder ein Äquilibrieren des Papiers ist nicht erforderlich.

Nach dem Entwickeln wird im heissen Luftstrom getrocknet. Bei den Proteinen erfolgt der Nachweis durch Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B-Lösung (10 min Einlegen). Der überschüssige Farbstoff wird mit einer Waschlösung aus 10 % Essigsäure, 45 % Methanol und 45 % Wasser entfernt. Die Nucleinsäuren werden mit einer 0.25 % wässrigen Toluidinblaulösung gefärbt (5 min Einlegen), der restliche Farbstoff mit Leitungswasser ausgewaschen.

Besonderheiten bei anderen Trägermaterialien

Kartonstarkes Papier (Schleicher und Schüll 2316). Es können grössere Substanzmengen aufgetragen werden (s. Tabelle III). Die R_F -Werte verändern sich häufig gegenüber den auf normalem Papier gemessenen.

Dünn- und Dickschichten (Zellulose und Kieselgel). Die Herstellung der Platten geschieht in der üblichen Weise, wobei beim Herstellen der Suspension ein elektrisches Mischgerät verwendet werden sollte. Zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse ist eine gleichmässige Herstellung der verwendeten Platten sehr wesentlich. Z. T. haben wir mit Vorteil Fertigplatten verwendet (Tabelle IIb). Das Auftragen der Substanz soll bei Dünn- und Dickschichtplatten besonders sorgfältig erfolgen.

Nach dem Entwickeln und Trocknen werden die Platten mit einem Fixierlack besprüht. Danach erfolgt die Färbung wie oben für Papier angegeben. Die mit einem Fluoreszenzindikator versehenen Platten (Zell. 1) wurden nur für Nucleinsäuren verwendet. Der Nachweis erfolgt hierbei ohne Nachbehandlung durch Beobachtung der Fluoreszenzauslöschung im U.V.-Licht.

Materialien

Eine Zusammenstellung der getrennten Substanzen mit Herkunftsangabe findet sich in Tabelle IIa.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse, die bei der Chromatographie der in Tabelle IIa aufgeführten Proteine und Nucleinsäuren mit der Gradiententechnik erzielt wurden, sind in den Tabelle IIIa und b zusammengestellt.

Serumproteine

Die Lage der einzelnen papierchromatographischen Banden für die untersuchten Gesamtseren sind bei allen vier species gleich. Jedoch differieren die Seren in bezug

TABELLE IIa

DIE MIT DEM GRADIENTENVERFAHREN AUF PAPIER UND DÜNN- BZW. DICKSCHICHTEN FRAKTIONIERTEN SUBSTANZEN

Substanz	Herkunft	Lösungsmittel	Konz. (% g/v)	Bezeichnung
<i>Serumproteine</i>				
Gesamtserum: Mensch, Kaninchen, Meerschwein- chen, Hammel, Kalb	—	—	ca. 7	—
Albumin, Mensch Rind	Fa. Serva, Heidelberg Fa. Serva, Heidelberg	Hanks Lösung Hanks Lösung	I I	Albumin aus Humanserum krist. reinst ca. 98 % Albumin aus Rinderserum lyophil. rein Fr-V > 95 %
α -Globulin, Mensch	Fa. Serva, Heidelberg	Hanks Lösung	I	α -Globulin aus Humanserum lyophil. rein, 95 %
<i>Basische Proteine</i>				
Salmin	Fa. Serva, Heidelberg	HCl, 0.01 N	2	Protaminsulfat reinst, Salmin vom Lachs
Protamin	Pharm. Präparat	—	5	Protaminhydrochlorid
Histon aus Walkertumor Rattenleber Rattenmilz Kaninchenmilz Kalbsthymus	Darstellung nach (4) Fa. Schuchardt, München	HCl, 0.01 N HCl, 0.01 N	I I	— Histonsulfat aus Thymusdrüsen
<i>Insuline</i>				
Altinsulin	Pharm. Präparat	—	40 IE/ml	—
Depotpräparat 1 2	Pharm. Präparat Pharm. Präparat	— —	40 IE/ml 40 IE/ml	Zn-Insulin-Protaminat mit Kristallinsulin
<i>Nucleinsäuren</i>				
RNS, hochmolekular	Fa. Serva, Heidelberg	H ₂ O, mit NH ₃ pH \leq 7	< 1	Ribonucleinsäure p.A., Hochmolekular aus Hefe
s-RNS	Fa. Boehringer, Mannheim	H ₂ O, mit NH ₃ pH \leq 7	< 1	Lösliche Ribonucleinsäure (Bierhefe)
Polyadenylsäure	Fa. Boehringer, Mannheim	H ₂ O, mit NH ₃ pH \leq 7	< 1	Polyadenylsäure, Arbeitsmuster

TABELLE IIb

DIE BENUTZTEN TRÄGERMATERIALIEN UND HILFSSUBSTANZEN

<i>Material</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Schichtdicke</i>	<i>Bezeichnung in Tabelle III a und b</i>
Papiertyp 2043 b Mgl 2316	Schleicher und Schüll, Dassel Schleicher und Schüll, Dassel	— —	2043 b Mgl 2316
Zellulose 300 F ₂₅₄ Nr. 144 Nr. 144 Nr. 1440	Macherey und Nagel, Düren Schleicher und Schüll, Dassel Schleicher und Schüll, Dassel Schleicher und Schüll, Dassel	0.25 mm 0.25 mm 1 mm Fertigplatten	Zell. 1a Zell. 2a Zell. 2b 1440
Kieselgel GF ₂₅₄ nach STAHL	E. Merck, Darmstadt	0.25 mm	KG
Amidoschwarz 10 B	E. Merck, Darmstadt	—	Anwendung als 0.7 % Lösung in 10 % Essigsäure, 45 % Methanol, 45 % Wasser
Fixierlack	Fa. Roth, Karlsruhe	—	Zum Fixieren der Dünn- und Dickschichten

ZUSAMMENSTELLUNG DER AUF DEN PAPIERTYPEN SCHLEICHER UND SCHÜLL 2043 b Mgl UND 2316 ERZIELTEN TRENNUNGEN

Substanz	Trägermaterial	LMS (s. Tabelle I)	R _F -Werte	Zahl der Komponenten
<i>Serumproteine</i>				
Gesamtserum, Mensch	2043 b Mgl	I		
Kaninchen	2043 b Mgl	I		
Meerschweinchen	2043 b Mgl	I	0.00 0.13 0.33 0.63 (0.50) ^a 0.96 (0.87) ^a	4
Hammel	2043 b Mgl	I		
Kalb	2043 b Mgl	I		
Albumin, Mensch	2043 b Mgl	I	0.63 0.98	2
Mensch	2043 b Mgl	6	0.23 0.35 0.79 1.00	4
Rind	2043 b Mgl	6	0.36 0.80 1.00	3
α-Globulin, Mensch	2043 b Mgl	I	0.00 0.14 0.21 0.39 0.53	4
<i>Protamine</i>				
Salmin	2043 b Mgl	I	0.00 0.21 0.34 0.50 0.85	4
	2043 b Mgl	6	0.00 0.13 0.24 0.33 0.58	4
	2043 b Mgl	7	0.00 0.14 0.51 ^b 0.79 0.97 1.00	5
	2043 b Mgl	9	0.00 0.14 0.32 0.42 0.57 0.83	5
	2043 b Mgl	11	0.00 0.14 0.23 0.37 0.43 0.97 1.00	6
	2043 b Mgl	12	0.00 0.17 0.23 0.36 0.54 0.91 1.00	6
	2316 ^c	I	0.00 0.21 0.38 0.55 0.87 1.00	5
Protamin, pharm. Präparat	2043 b Mgl	I	0.00 0.19 0.34 0.51 0.66 0.88 1.00	6
	2043 b Mgl	11	0.00 0.16 0.23 0.37 0.56 0.83	5
	2043 b Mgl	12	0.00 0.14 0.26 0.40 0.58 0.79 0.93 1.00	7
<i>Histone</i>				
Walkertumor, Ratte	2043 b Mgl	I		
Rattenleber	2043 b Mgl	I		
Rattenmilz	2043 b Mgl	I	0.00 0.17 0.27 0.48 0.70 0.77 0.82	6
Kaninchenmilz	2043 b Mgl	I		
Walkertumor, Ratte	2043 b Mgl	4	0.00 0.12 0.52 0.65 0.77	4
	2043 b Mgl	6	0.00 0.08 0.28 0.41 0.67	4
	2043 b Mgl	7	0.00 0.03 0.09 0.25 0.38 0.47	5
	2316 ^d	I	0.00 0.08 0.16 0.32 0.56 0.96 1.00	6
Kalbthymus	2043 b Mgl	I	0.00 0.18 0.35 0.52 0.87 0.92 1.00	6
	2043 b Mgl	4	0.00 0.14 0.40 0.60 0.69 0.84 0.92 0.94 1.00	8
	2043 b Mgl	6	0.00 0.08 0.30 0.40 0.54 0.70 0.93 1.00	7
	2043 b Mgl	7	0.00 0.02 0.06 0.16 0.31 0.50 0.55 0.67 0.72 0.90 0.99 1.00	11

<i>Insuline</i> Alinsulin Depotinsulin I Depotinsulin II	2043 b Mgl	I	0.49	I
	2043 b Mgl	I	0.19 0.35 0.53	3
	2043 b Mgl	I	0.05 0.53	2
<i>Nucleinsäuren</i> RNS, hochmolekular	2043 b Mgl	3	0.00 0.06 0.14 0.55 1.00	4
	2043 b Mgl	5	0.00 0.02 0.15 0.26	3
	2043 b Mgl	10	0.00 0.17 0.32	2
	2316 ^d	3	0.00 0.06 0.23 0.65	3
	2043 b Mgl	8	0.00 0.28 0.38 0.52 0.70 ^b 1.00	5
s-RNS	2043 b Mgl	10	0.00 0.23 0.33 0.46	2
Polyadenylsäure	2043 b Mgl	10	0.00 0.25	I

^a In Klammern die R_F -Werte beim Auftragen kleiner Probenmengen.

^b Breite, schwach gefärbte Bande.

^c Getrennte Menge 0.23 mg/cm.

^d Getrennte Menge 0.30 mg/cm.

TABELLE IIIb

ZUSAMMENSTELLUNG DER AUF DÜNN- UND DICKSCHICHTPLATTEN ERZIELTEN TRENNUNGEN

Substanz	Trägermaterial	LMS (s. Tabelle I)	R_F -Werte	Zahl der Komponenten
<i>Serumproteine</i> Gesamtserum, Mensch Kaninchen	I400	I	0.00 0.07 0.25 0.43 0.68	4
	I400	I		
<i>Protamine</i> Salmin	Zell. 2a	I	0.18 0.34 0.48 0.81 1.00	5
	Zell. 2b	I	0.16 0.32 0.49 0.77 1.00	5
	KG	I	0.00 0.06 0.10 0.23 0.31 0.38 0.43 0.63 0.81	8
<i>Histone</i> Walkertumor, Ratte	Zell. 2a	I	0.00 0.15 0.38 0.62 0.76 0.84 1.00	6
	Zell. 2b	I	0.00 0.13 0.30 0.52 0.77 0.86 1.00	6
<i>Nucleinsäuren</i> RNS, hochmolekular	Zell. 1a	3	0.22 0.52 0.74 1.00	4
	Zell. 1a	10	0.21 0.30 0.36	3
s-RNS	Zell. 1a	8	0.20 0.31 0.42 0.80-1.00	4
	Zell. 1a	10	0.22 0.33 0.47-0.55	3
	Zell. 1a	8	0.00 0.19	I
Polyadenylsäure				

auf die Verteilung des Materials auf die verschiedenen Komponenten. Beim Kaninchen z.B. ist eine besondere Betonung der 3. Bande ($R_F = 0.63$) charakteristisch. Chromatographiert man hämolytische Seren, so ist eine Verstärkung der beiden unteren Banden zu verzeichnen.

Vergleicht man die R_F -Werte von Chromatogrammen, bei denen das gleiche Serum in verschieden grossen Mengen aufgetragen wurde, so erweisen sich diejenigen der beiden unteren (startnahen) Banden als relativ konstant. Dagegen läuft die 4. Komponente bei der Chromatographie von grösseren Probenmengen sehr nahe der Front, bei kleineren Auftragemengen bei einem $R_F = 0.87$; die Verschiebung der 3. Komponente von unten ist etwas geringer.

Die Chromatographie von Humanalbumin allein führt zu einem Sichtbarwerden nur der 3. und 4. Bande, die Globuline verteilen sich dagegen auf die unteren Fraktionen. Albumin aus menschlichem und aus Rinderserum sind in geeigneten LMS fraktionier- und unterscheidbar (Tabelle IIIa). Die Chromatographie von Serum auf Zellosedünnschichten ergibt etwa die gleichen Auftrennungen wie auf Papier. Auch auf Kieselgeschichten lässt sich Serum chromatographieren und trennen, sofern dem Kieselgel geringe Mengen (ca. 5%) Stärke beigemischt sind (Schleicher und Schüll-Fertigplatten 1500 S, s. auch Lit. 3). Jedoch ist die Trennung, die im übrigen der auf Papier und Zelloseschicht entspricht, leichter durch Längsstreifen gestört.

Protamine

Die beiden untersuchten Protamine zeigen bei der Chromatographie die grösste Unabhängigkeit vom Trägermaterial von allen untersuchten Substanzen: Auch vom Laufmittelsystem war die Fraktionierbarkeit relativ unabhängig (Fig. 2 und 3).

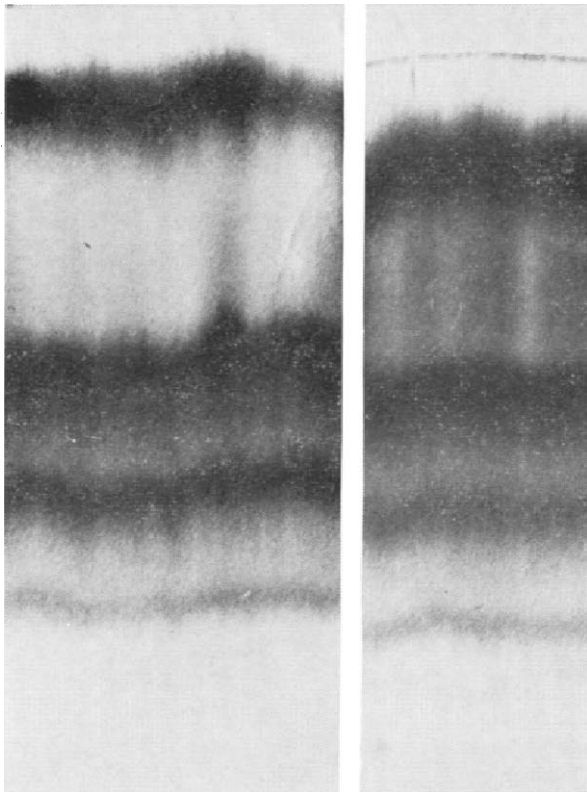


Fig. 2. Chromatographie von Salmin auf Papier von Typ Schleicher und Schüll 2043 b Mgl (links) und Schleicher und Schüll 2316 (rechts) unter Verwendung des LMS 1.

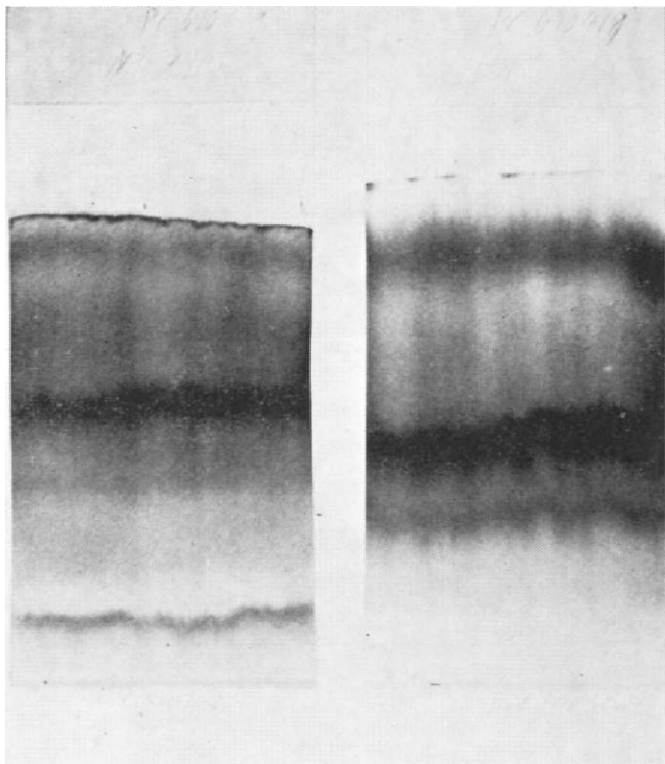


Fig. 3. Chromatographie des pharmazeutischen Protaminpräparates, das wir untersuchten, mit LMS 12 (links) und LMS 1 (rechts) auf Schleicher und Schüll 2043 b Mgl Papier.

Histone

Bei den Histonen ist bemerkenswert, dass die Papierchromatographie der Papierelektrophorese durchweg überlegen ist. Das Walkertumorhiston z.B. ist papierelektrophoretisch in höchstens drei¹, papierchromatographisch dagegen in sechs Komponenten zerlegbar. Auch bei dieser Proteingruppe wurde wie bei den Serumproteinen gefunden, dass die R_F -Werte der Komponenten für Präparate recht verschiedener Herkunft (Walkertumor der Ratte, Rattenleber, Kaninchenmilz und Rattenmilz) gleich sind, dass aber die Verteilung des Materials auf die verschiedenen Komponenten bei Histonen aus verschiedenen Geweben verschieden ist. So enthält z.B. die von uns mit E bezeichnete zweitoberste Bande (s. Lit. 4, $R_F = 0.77$) bei den Histonen aus der Milz von Ratte und Kaninchen mehr Material als bei den anderen untersuchten Histonen. Diese Bande enthält zusammen mit derjenigen mit dem höchsten R_F -Wert (E und F unserer Nomenklatur, s. Lit. 4) die Gruppe der sog. "sehr-Lysin-reichen Histone". Diese können selektiv und ohne Gradientenmethode mit 0.82 N Perchlorsäure, in der die übrigen Histone unlöslich sind, chromatographiert werden^{2,4}. Bei dieser Chromatographie wurden für die beiden Milzhistone folgende R_F -Werte gefunden:

Rattenmilzhiston: 0.00 0.05 0.37 0.98 1.00
 Kaninchenmilzhiston: 0.00 0.08 0.63 0.90 1.00

Die zweite Bande von unten ist offensichtlich speciespezifisch. Eine zweite Ähnlichkeit mit den Serumproteinen betrifft die Abhängigkeit der R_F -Werte der

beiden obersten Banden von der aufgetragenen Menge, die offensichtlich ein allgemeineres Kennzeichen unserer Technik darstellt.

Die Histone können ausser auf Papier vom Typ Schleicher und Schüll 2043b Mgl auch auf Schleicher und Schüll 2316 und auf Zellulosedünn- und -dickschicht getrennt werden. Die Papierchromatographie war der Dünn- und Dickschicht trotz weitgehender Analogie überlegen.

Insuline

Fraktioniert wurden drei pharmazeutische Präparate: Ein Altinsulin und zwei Depotinsuline (Tabelle IIa). Ihre Unterscheidung auf den Papierchromatogrammen ist leicht möglich. Die Anfärbung ist dadurch etwas erschwert, dass beim Waschvorgang ein schnelles Verblässen der Banden zu beobachten ist. Dies beruht wahrscheinlich auf einem Herauslösen des Materials durch die Waschflüssigkeit. Es kann jedoch durch ein Beschleunigen des Waschens leicht wieder ausgeglichen werden. Bei ausgedehnteren Versuchen sollte jedoch die Färbung mit Amidoschwarz 10 B durch eine andere Nachweismethode ersetzt werden.

Andere Proteine

Eine Reihe anderer Proteine wurde ebenfalls auf ihre papierchromatographische Fraktionierbarkeit untersucht. Ein LDH-Präparat aus Kaninchenmuskel (Fa. Boehringer, Mannheim) konnte durch LMS 9 in drei Komponenten getrennt werden. Auch Parathormon und Hypophysenvorderlappenextrakte liessen sich fraktionieren (LMS 6). Wie beim Insulin waren auch hier Färbeschwierigkeiten zu beobachten. Erwähnt sei an dieser Stelle auch die papierchromatographische Auftrennung von Milchserum.

Nucleinsäuren

Unseres Wissens ist die papierchromatographische Auftrennung einer Nucleinsäure erstmals in Lit. 4 beschrieben worden. Die beiden kommerziellen RNS-Präparate, die nun untersucht wurden, liessen sich besonders einfach auf den Zelluloseplatten mit Fluoreszenzindikator chromatographieren. Hierbei kann jede Nachbehandlung wegfallen. Die Polyadenylsäure, die wir chromatographierten, lief in allen Versuchen einheitlich.

Andere Trägermaterialien als das Papier von Typ Schleicher und Schüll 2043b Mgl, das wir für die meisten unserer Versuche verwendeten, wie das stärkere Papier (Schleicher und Schüll 2316) und die verschiedenen benutzten Zellulose Typen ergeben meist ähnliche Trenneffekte. Jedoch ist die Störungsanfälligkeit z.B. durch unregelmässiges Auftragen oder durch Randeffekte im allgemeinen bei den Schichten grösser. Dies gilt besonders für die Kieselgelschichten (s. auch Lit. 3). Für präparative Zwecke ist die Anwendung der dickeren Papiersorte oder der Dickschichten günstig. Die grösste Anwendungsbreite fanden wir bei unseren Versuchen für Schleicher und Schüll 2043b Mgl Papier, die kleinste für die Kieselgelschichten ohne Stärkezusatz. Die trennbaren Mengen liegen zwischen 5 $\mu\text{g}/\text{cm}$ (2043b Mgl, Mindestmenge beim Nachweis durch Amidoschwarzfärbung) und 300 $\mu\text{g}/\text{cm}$ (Maximalmenge für 2316, wenn alle Komponenten getrennt werden sollen). Die optimale Auftragemenge für Schleicher und Schüll-Papier 2043b Mgl liegt bei ca. 20 $\mu\text{g}/\text{cm}$ Papierbreite.

Bemerkenswert ist der grosse Anwendungsbereich der Methode, der sich auf neutrale, schwach saure und basische Proteine und auf Ribonuclein- bzw. Polyadenylsäuren erstreckt bei Molekulargewichten zwischen *ca.* 6,000 und 300,000. Es wurde bei unseren Versuchen bewusst darauf verzichtet, für jeden Spezialfall einen besonderen Gradienten auszuarbeiten; für Serienuntersuchungen erscheint dies jedoch angebracht. Hingewiesen sei auch auf die relativ kurze Fraktionierungszeit von nur etwa 3 h einschliesslich der Färbung.

ANDERE PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNGEN VON PROTEINEN

Die Chromatographie des gleichen Salminpräparates, das auch mit dem Gradientenverfahren fraktioniert werden kann (s.o.), mit verdünnten Salzlösungen und selbst destilliertem Wasser, ergab in einigen Fällen ebenfalls eine Auftrennung. Für die Salzlösungen wurde dabei eine optimale Konzentration bei 0.01 *M* gefunden. NH_4Cl und H_2O lieferten eine Trennung in fünf, NaCl und Natriumacetat eine solche in vier Komponenten². Trotz der Einfachheit und Schnelligkeit der Methode ist das Gradientenverfahren überlegen, da die Trennung der einzelnen Komponenten voneinander bei ihm besser ist und seine Anwendbarkeit bei weitem universeller gefunden wurde. Auch zeigten die ohne Gradienten entwickelten Chromatogramme die Besonderheit, dass die R_F -Werte von der Laufstrecke abhingen, so dass bei längeren Laufzeiten die R_F -Werte ein und derselben Komponente kleiner waren. Das Verhältnis der Laufstrecken verschiedener Komponenten untereinander war dagegen annähernd konstant.

Eine andere Trennung mit nur einem Laufmittel wurde in einem Spezialfall bei den Histonen erreicht: Hier wanderten beim Entwickeln in 0.82 *N* Perchlorsäure nur die sog. "sehr-Lysin-reichen Histone" (= F 1) und trennten z.B. beim Kalbshymushiston in sechs Komponenten auf. Die anderen Histonfraktionen sind in dem Laufmittel unlöslich, so dass die F 1 selektiv chromatographiert wird⁴.

Die genannten Ergebnisse zeigen, dass in Einzelfällen auch eine solche Papierchromatographie ohne Gradient möglich ist. Jedoch verliefen Versuche, mit den erwähnten Salzlösungen, mit HCl , H_2O , Saccharoselösung, sowie in einigen Fällen mit Propanol/Wasser (3:1) und Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:1) die im Gradientenverfahren getrennten Substanzen (Tabelle IIa) zu trennen, negativ.

DISKUSSION

Chromatographische Trennungen von Proteinen m.H. von Salzlösungen wurden bereits 1948 von TISELIUS^{15, 16} vorgeschlagen. Wenn man zu Lösungen aussalzbarer, Proteine nur einen Teil (*ca.* ein Drittel) der zur Fällung nötigen Salzmenge gibt, werden sie besser an Adsorbentien gebunden als aus salzarmen Lösungen: Man findet, "dass sowohl bei manchen Proteinen als auch bei einer Reihe von Farbstoffen u.a. aussalzbaren Substanzen in dieser Weise starke Adsorptionseffekte entwickelt werden können, und zwar an verschiedenen verhältnismässig indifferenten Adsorbentien wie Filtrierpapier, Stärke, Kieselgel u.a. und mit wesentlich geringeren Salzkonzentrationen als für die Ausfällung erforderlich. Diese Adsorption scheint reversibel zu sein; die Elution erfolgt durch Waschen mit Wasser oder mit einer schwächeren Salzlösung"¹⁶. TISELIUS zeigte in der gleichen Arbeit, dass eine Mischung von zwei Farb-

stoffen bei der Chromatographie auf Papier mit Wasser als Entwicklungsflüssigkeit ungetrennt blieb, während die Entwicklung mit 1 *M* und 2 *M* Salzlösungen zu einer Aufspaltung in vier bzw. fünf Komponenten führte. Die Anwendung des Aussalzprinzips für die Chromatographie von Proteinen zeigten MITCHELL und Mitarbeiter¹⁰. Die Autoren trennten Adenosin-Desaminase, Amylase und eine Phosphatase mit ihrer Chromatopiletechnik durch Entwicklung mit einem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten fallender Konzentration. Auch die Trennung von Enzymen mit wässrigem Alkohol und Aceton⁷, kann wohl auf einen ähnlichen Mechanismus zurückgeführt werden, umso mehr als durch Frontalanalyse¹⁷ die Ausbildung eines Laufmittelgradienten erfolgt, so dass eine Trennung nach Ausfällbarkeit denkbar ist.

Für die Papier- und Dünnschichtchromatographie ausfällbarer Substanzen sind demnach Laufmittel günstig, die nur einen Teil der zur Präzipitation nötigen Konzentration des Fällungsmittels enthalten, und zwar unter solchen Bedingungen, dass ein Absinken dieser Konzentration während des Entwickelns erreicht wird. Die Ausfällung bzw. die Adsorption kann durch Salze, wie von TISELIUS vorgeschlagen, durch Säuren in nicht zu hoher Konzentration oder durch Alkohol und Aceton erfolgen. Ausser bei unserem HCl-Essigsäure-Gradienten (LMS 1 der Tabelle I) wurde die durch Säure erzeugte Adsorption z.B. von GOPPOLD-KREKELS UND LEHMANN⁸ bei ihrer Trennung verschiedener Protamine m.H. eines Trichloressigsäure enthaltenden Laufmittels benutzt. Die zweite Bedingung, der Gradient (fallender Konzentration), kann entweder durch Zutropfen von Wasser oder verdünnten Lösungen kontinuierlich oder, wie von uns mit Vorteil benutzt, diskontinuierlich durch das Entwickeln in verschiedenen Salzlösungen fallender Konzentration erreicht werden. Offenbar können—in Erweiterung des Begriffs der Aussalzchromatographie—ausfällbare Substanzen auf Papier und anderen Trägern dadurch getrennt werden, dass man durch eine geringere als zur Ausfällung aus der Lösung nötige Konzentration eines Fällungsmittels die Adsorption an den Träger begünstigt und anschliessend durch langsame Herabsetzung seiner Konzentration die Substanzkomponenten nach ihrer Adsorptions- bzw. Fällbarkeit fraktioniert. Diese Technik ist für Proteine und, worauf Tiselius hinwies, für Farbstoffe anwendbar, im Prinzip aber wohl für alle fällbaren Substanzen, wofür die Nucleinsäuren (s.o.) ein Beispiel darstellen. Die Ausfällbarkeit hochmolekularer RNS durch 1 *M* NaCl-Lösung wurde z.B. durch COLTER *et al.*⁶ beschrieben. Die Ergebnisse von MUIĆ *et al.*¹¹, die mit Salzlösungen steigender Konzentration ein Schlangengift und verschiedene künstliche Proteingemische auftrennten, lassen es möglich erscheinen, in manchen Fällen auch durch "Einsalz-Chromatographie" entwickeln zu können. Hierfür sprechen auch die relativ niedrigen Konzentrationen, die von den Autoren verwendet werden. Denkbar ist aber auch, dass andere, insbes. einfache Adsorptionseffekte oder die geringe Ionenaustauscherwirkung der Zellulose bei diesen Experimenten eine Rolle spielen. Der Versuch, mit einer ähnlichen Anordnung die Walkertumor-Histone zu fraktionieren, führte zu keinen befriedigenden Ergebnissen¹. Nach unseren Erfahrungen ist die von uns benutzte Anordnung besonders günstig zur Anwendung der Aussalz- bzw. Ausfällungschromatographie von Proteinen und Nucleinsäuren.

Bei unseren Versuchen mit Proteinen zeigte der Salzsäure-Essigsäure-Gradient (LMS 1 der Tabelle I) auf Papier den grössten Anwendungsbereich. Bei den untersuchten Proteingemischen dürfte dabei die Ausfällung nach dem pH zurücktreten. Bei den Nucleinsäuren gaben die beiden NaCl- (LMS 3 und 8 der Tabelle I) und der

Na-acetat-Gradient (LMS 10 der Tabelle I) auf Papier und auch Zellulosedünnschicht mit Fluoreszenzindikator die besten Trennungen. Auf die hierfür gültigen Aussalzbedingungen, wie sie in der Literatur beschrieben werden, wurde oben bereits kurz hingewiesen. Bei den Salzgradienten gingen wir dabei im allgemeinen so vor, dass eine neue Substanz zunächst mit einem der Standardgradienten entwickelt wurde. Liegen die Banden alle im unteren Drittel des Chromatogramms, war der Adsorptionseffekt also zu stark, so wurde ein neues Chromatogramm mit einem Laufmittelsystem mit niedrigerer Anfangskonzentration entwickelt. Umgekehrt wurde bei grösseren Substanzmengen in oder nahe der Laufmittelfront ein System mit höherer Anfangskonzentration benutzt. Bei der grossen Zahl der möglichen Bedingungen fanden wir es günstig, bei einer beschränkten Anzahl von Fällungsmitteln und Konzentrationen zu bleiben und unter ihnen für jede zu trennende Substanz die optimalen Bedingungen zu suchen. Dies schliesst natürlich nicht aus, in Spezialfällen spezielle Gradienten zu entwickeln und zu verwenden. Nach unseren Erfahrungen sollten sich auch andere wasserlösliche und ausfällbare Substanzen mit der beschriebenen Gradientenmethode auf Papier und auch auf Dünnschicht trennen lassen.

DANK

Der Autor dankt Herrn Dr. OSKAR BAUER, Speyer, für die Möglichkeit, in seinem Laboratorium experimentieren zu können.

Die Firma Schleicher und Schüll, Dassel, hat dem Autoren eine Reihe von Mustern ihrer Papiere und Dünnschichtfertigplatten zur Verfügung gestellt. Auch ihr gebührt unser besonderer Dank.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird zusammenfassend über eine grössere Zahl von chromatographischen Auftrennungen von Proteinen und Nucleinsäuren in ihre Komponenten auf Papier verschiedener Stärke, Dünn- und Dickschichten mit Hilfe einer neu entwickelten Gradiententechnik berichtet. Im Sinne einer Aussalz- bzw. Ausfällungschromatographie wird hierbei nacheinander ohne Zwischentrocknungen in verschiedenen Lösungen fallender Konzentration des gleichen Fällungsmittels entwickelt. Als solche Fällungsmittel dienen vorwiegend HCl und einige Salze. Die so fraktionierten Substanzen umfassen Serum und Serumfraktionen verschiedener Species, Protamine, Histone aus mehreren Tierarten und Organen, einige Insulinpräparate und drei Nucleinsäuren. Neben den bisherigen Ergebnissen werden Technik und Mechanismus ausführlich erörtert. Weitere Protein- und Nucleinsäurefraktionierungen nach dieser Methode erscheinen möglich.

SUMMARY

Chromatographic fractionations are reported of several proteins and nucleic acids into their components on paper and on thin and thick layers of cellulose and in some cases on silica gel thin layers by a newly developed gradient technique. This technique is based on the salting-out method proposed by TISELIUS. It consists of subsequent development in solutions of the same precipitant, such as HCl and several

salts, of decreasing concentration. Serum proteins from man, guinea-pig, sheep and calf, protamines, histones derived from rat liver, Walker carcinosarcoma, rabbit and rat spleen and calf thymus and some pharmaceutical insulin preparations as well as three nucleic acids have been separated this way. The exact technique used is described and the probable mechanism of the separation is discussed.

LITERATUR

- 1 K. BAUER, unveröffentlichte Ergebnisse.
- 2 K. BAUER, in Vorbereitung.
- 3 K. BAUER, in Vorbereitung.
- 4 K. BAUER UND P. BEHEIM, *Z. Krebsforsch.*, 69 (1967) 230.
- 5 M. BIER (Herausgeber), *Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1959.
- 6 J. S. COLTER UND R. A. BROWN, *Science*, 124 (1956) 1077.
- 7 K. V. GIRI UND A. L. N. PRASAD, *Nature*, 167 (1951) 859; *ibid.*, 168 (1951) 786.
- 8 A. GOPPOLD-KREKELS UND H. LEHMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 313 (1958) 147.
- 9 E. LEDERER UND M. LEDERER, *Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1957.
- 10 H. K. MITCHELL, M. GORDON UND F. A. HASKINS, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 1071.
- 11 N. MUIĆ, A. MENIGA UND M. FLEŠ, *Arch. Biochem.*, 77 (1958) 20.
- 12 Z. PADR, J. URBANKOVA UND S. JEHLICKA, *Cesk. Farm.*, 4 (1955) 311; zitiert nach I. M. HAIS UND K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Bd. I, Fischer, Jena, 1958.
- 13 L. P. RIBEIRO, E. MITIDIERI UND O. R. AFFONSO, *Paper Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, 1961.
- 14 F. A. ROBINSON UND K. L. A. FEHR, *Biochem. J.*, 51 (1952) 298.
- 15 A. TISELIUS, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.*, 26B, No. 1 (1948).
- 16 A. TISELIUS, *Naturwiss.*, 37 (1950) 25.
- 17 A. TISELIUS, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 245.
- 18 F. TURBA, *Chromatographische Methoden in der Proteinchemie*, Springer Verlag, Berlin, 1954.
- 19 G. ZIMMERMANN UND K. H. KLUDAS, *Chem. Tech. (Berlin)*, 5 (1953) 203.

J. Chromatog., 32 (1968) 529-542