

CHROM. 3495

DIE CHROMATOGRAPHIE VON PROTEINEN UND NUCLEINSÄUREN AUF PAPIER UND DÜNNSCHICHTEN

II. SCHNELLCHROMATOGRAPHIE. DER EINFLUSS DES PAPIERTYPS. KURVENMÄSSIGE DARSTELLUNG*

KLAUSDIETER BAUER**

Speyer, 15 P. Drachstrasse (Deutschland)

(Eingegangen den 6. März 1968)

SUMMARY

*Chromatography of proteins and nucleic acids on paper and thin layers**II. Rapid chromatography. The influence of the type of paper. Graphical representation*

The influence of the carrier material on the separation of proteins by a newly developed method of paper (and thin layer) chromatography is reported. The technique, which is applicable to a number of proteins including serum proteins, histones, protamines and others as well as to RNA, is based on salting-out or precipitation chromatography.

After special application of the sample (as a thin line) the chromatogram is developed in discontinuous salt or acid gradients of decreasing molarity, so that the components of the sample are adsorbed and desorbed at different times and in this way migrate differently.

In this communication the possibility is demonstrated of fractionating both human serum proteins and protamines on paper of the type 2040 a (Schleicher & Schüll, Dassel, W. Germany) in only 25–30 min, whereas the developing time for standard papers is 75–90 min.

A number of typical chromatograms of serum proteins, histones, protamines, pharmaceutical insulin preparations, and of RNA developed by the new technique are shown in the form of densitometric drawings.

With this method it is possible to carry out the technically very simple fractionation of a number of proteins and of some nucleic acids (especially RNA) in a relatively very short time.

Im ersten Teil dieser Arbeit haben wir zusammenfassend über unsere Ergebnisse mit der Gradientenchromatographie verschiedener Proteine und Nucleinsäuren (RNS und Polyadenylsäure) auf Papier und Dünnschichtplatten berichtet. Bei dieser

* Erste Mitteilung siehe Lit. 1.

** Neue Adresse: Serologisches Institut der Universität Heidelberg, Vossstrasse 2.

Methode erfolgt die Entwicklung in einem diskontinuierlichen Gradienten fallender Konzentration eines Fällungsmittels (Salzlösungen oder Säuren). Dadurch wird zunächst die Adsorption des Proteins (bzw. der Nucleinsäure) an den Träger begünstigt. Durch Herabsetzung der Konzentration des Fällungsmittels wird anschliessend nacheinander die Desorption und die nachfolgende Wanderung der einzelnen Komponenten der Probe erreicht. Zu den so fraktionierten Eiweissstoffen gehören u.a. Serumproteine, basische Eiweisse — Histone und Protamine — und verschiedene pharmazeutische Insulinpräparate.

Im folgenden werden Untersuchungen über den Einfluss des Papiertyps auf den Trenneffekt beschrieben. Die Möglichkeit, mit einem Papiertyp Fraktionierungen in einem Drittel der bisher erforderlichen Zeit — reine Entwicklungszeit ohne Färbung 25–30 min — durchführen zu können, sei hervorgehoben. Kurze Beschreibungen werden von dünnschichtchromatographischen Untersuchungen gegeben, die ebenfalls den Einfluss des Trägermaterials in der Gradientenchromatographie klären sollen. Ausserdem publizieren wir eine Reihe typischer Einzelchromatogramme im densitometrischen Bild. Wir halten diese Art der Darstellung für die Auswertung von Gradientenchromatogrammen für besonders geeignet. Zusätzlich berichten wir über Erfahrungen mit zwei neuen Laufmittelsystemen.

MATERIAL UND METHODEN

Technik

Die zu trennende Substanz wird wie in Lit. 1 angegeben auf das Papier aufgetragen (Ausmasse etwa 10×25 cm; 2.5 cm vom unteren Ende entfernt als von Rand zu Rand durchgehende Linie), und nacheinander ohne Zwischentrocknungen in den zu einem der Laufmittelsysteme der Tabelle I gehörenden Flüssigkeiten entwickelt. In jeder dieser Flüssigkeiten wird beim Standardpapier (2043 b Mgl, ebenso auch 2045 a, 214, Wh. 1; Symbole und abweichende Zeiten siehe Tabelle II und III) 15 min lang entwickelt. Einzelheiten der Technik siehe Lit. 1.

Substanzen

Getrennt wurden Humanserum, Hammelcitratblut und ein pharmazeutisches Protaminpräparat (das gleiche wie in Lit. 1 beschrieben). Für die Vergleiche zwischen den verschiedenen Trägern bei der Chromatographie von Protaminen fand nur dieses

TABELLE I

DIE BENUTZTEN LAUFMITTELSYSTEME (LMS)

Die Nummerierung ist eine Erweiterung der Tabelle I in Lit. 1. Die Entwicklung erfolgt nacheinander ohne Zwischentrocknung in Lösungen der angegebenen Konzentrationen. Näheres siehe Text.

LMS 1	Je 15 min*	HCl 1	N/0.25	N/0.1	N/0.01	N/Essigsäure 50 %	
LMS 1a	Je 15 min*	HCl 1	N/0.25	N/0.1	N/0.05	N/0.01	N/Essigsäure 50 %
LMS 13	Je 15 min*	MgSO ₄ 1	M/0.25	M/0.1	M/0.01	M/Essigsäure 50 %	
LMS 14	Je 15 min*	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1	M/0.25	M/0.1	M/0.01	M/Essigsäure 50 %	

* Entwicklungszeit für 2043 b Mgl, 2045 a, 214 und Wh. 1 (Bezeichnung der Sorten siehe Tabelle II) und für die Dünnschichten. Andere Entwicklungszeiten siehe in Tabelle III.

TABELLE II

ZUSAMMENSTELLUNG DER VON UNS UNTERSUCHTEN PAPIERSORTEN DER FIRMEN SCHLEICHER UND SCHÜLL, DASSEL, UND MACHEREY UND NAGEL, DÜREN, SOWIE DER MARKE WHATMAN

<i>Herkunft (Name)</i>	<i>Typ</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Bezeichnung im Text</i>
Schleicher und Schüll	2043 b Mgl	Linterspapier, mittelhart	2043 b Mgl
Schleicher und Schüll	2045 a	Linterspapier, hart	2045 a
Schleicher und Schüll	2040 a	Linterspapier, weich	2040 a
Macherey und Nagel	214	Linterspapier, mittelhart	214
Macherey und Nagel	218	Linterspapier, mittelhart	218
Macherey und Nagel	261	Linterspapier, mittelhart	261
Whatman	1	Standardpapier	Wh. 1
Schleicher und Schüll	289*	Pigmentpapier mit Kieselgel	289
Schleicher und Schüll	290*	Pigmentpapier mit CaCO ₃	290
Schleicher und Schüll	6	Glasfaserpapier, schnell laufend	6

* Diese Sorten sind nicht mehr im Handel.

TABELLE III

EIGNUNG DER UNTERSUCHTEN PAPIERSORTEN FÜR DIE GRADIENTENCHROMATOGRAPHIE VON SERUM UND PROTAMINEN

Die Symbole bedeuten: +++ = optimale Trennung der Komponenten; ++ = gute Trennung der Komponenten; + = weniger gute Trennung der Komponenten; — = nicht verwendbar; *t* = Einzelentwicklungszeit (min), d.h. Entwicklungszeit in den einzelnen Komponenten der LMS (Tabelle I)

<i>Papiertyp</i>	<i>Serum</i>	<i>Protamin</i>	<i>t</i>	<i>Bemerkungen</i>
2043 b Mgl	+++	+++	15	
2040 a	+++	+++	5	
2045 a	+++	+++	15	
289	+	++	10	Kieselgelpapier
290	—	+	12	CaCO ₃ -Papier
6	—*	—	4	Glasfaserpapier
214	+++	+++	15	
218	+	+++	20	
261	++	+++	20	
Wh. 1	+++	+++	15	

* Trenneffekt nachweisbar, aber nicht brauchbar.

Praeparat Verwendung. Die Gradientenchromatographie eines weiteren Protaminpraeparates (mit PP 2 = Pharmazeutisches Protaminpraeparat 2 bezeichnet) ist in Fig. 1 und 4b dargestellt.

Färbung

Sämtliche Proteine wurden mit Amidoschwarz 10 B nach der für Elektropherogramme üblichen Technik gefärbt¹. In einigen Fällen wurde auch eine Anfärbung mit Ölrot O auf Lipoproteine vorgenommen (Einlegen über Nacht in eine 0.5% Lösung in 60% Äthanol, kurze Wäsche mit Leitungswasser).

Die Kurvendarstellung

Sie erfolgte mit einem Zeiss-Densitometer. Von unseren etwa 1500 Chromatogrammen suchten wir einige typische zur Darstellung aus (siehe Fig. 3-7).

ERGEBNISSE

1. Der Einfluss des Papiertyps auf den Trenneffekt

In Tabelle III ist die Eignung der untersuchten Papiersorten für die Gradientenchromatographie, wie wir sie in unserer Versuchsreihe fanden, dargestellt. Bei einer ersten Gruppe von Papieren fanden sich praktisch identische Trennungsmuster, die auch den in Lit. 1 berichteten Ergebnissen auf 2043 b Mgl völlig entsprachen. Diese Gruppe umfasst ausser 2043 b Mgl die Typen 2045 a, 214 und Wh. 1 (Tabelle III). Auf anderen Papieren war entweder der Trenneffekt nur beim Protamin der ersten Gruppe ebenbürtig, oder die gegenseitige Abgrenzung der Komponenten war weniger gut. Dies liess sich bei zwei Papiersorten durch Verlängerung der Einzelentwicklungszeit (= Entwicklungszeit in jeder der Laufmittelsystemkomponenten) auf 20 min ausgleichen.

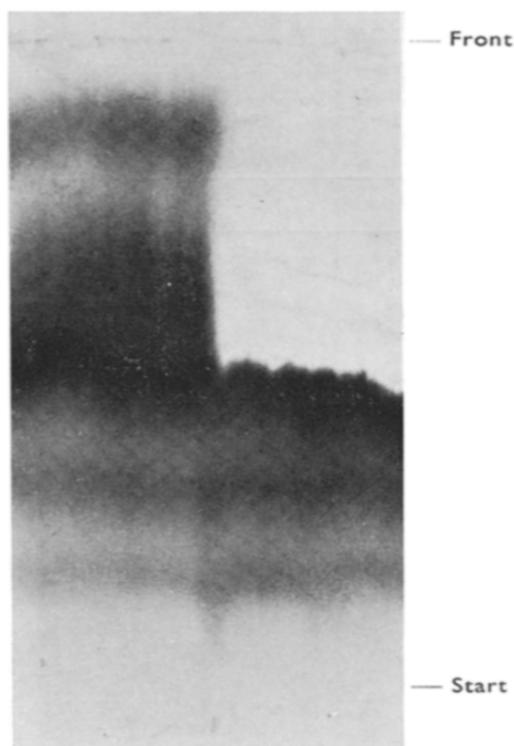


Fig. 1. Gradientenchromatogramm des zur Papiertestung verwendeten Protaminpräparates (links) und eines weiteren pharmazeutischen Protaminpräparates PP2 (rechts) auf 2043 b Mgl mit dem LMS 1.

Auf dem Glasfaserpapier liefen die Protamine an die Front. Das Humanserum wurde ähnlich wie bei den genannten Standardpapieren aufgetrennt; jedoch war das Trennungsmuster durch zahlreiche Störungen überlagert. Besonders im Hinblick auf die geringe mechanische Festigkeit des Papiers haben wir von einer ausgedehnten Verwendung des Glasfaserträgers abgesehen.

Schnellchromatographie

Die *Entwicklungszeit* in den Einzelkomponenten der LMS (Tabelle III) konnte bei den meisten Papieren, wie ursprünglich für 2043 b Mgl beschrieben¹, bei 15 min

bleiben. Ausnahmen sind die Typen 218 und 261, bei denen der beste Trenneffekt bei Einzelentwicklungszeiten von 20 min erreicht wurde. Beim Glasfaserpapier und beim Typ 2040 a waren dagegen bei den üblichen Ausmassen unserer Chromatogramme 4 bzw. 5 min als Einzelentwicklungszeiten erforderlich. Wir konnten feststellen, dass auf 2040 a-Papier dabei ebenso scharfe Trennungen möglich sind, wie in der dreifach längeren Zeit auf der Gruppe 2043 b Mgl, 2045 a, 214 und Wh. 1.

Diese Papiersorte kann daher — mindestens in den von uns untersuchten Fällen des Humanserums und des Protamins — zur Schnellchromatographie benutzt werden. Hierbei liegt die reine Laufzeit beim LMS 1 bei (5 mal 5 min =) 25 min. Die Anwendung des Gradientenverfahrens auf Dünnschicht erfordert dagegen die Normalzeit von je 15 min, das sind beim LMS 1 zusammen 75 min. Die Dünnschichtchromato-

TABELLE IV

ZUSAMMENSTELLUNG DER R_F -WERTE VON GRADIENTENCHROMATOGRAMMEN

A = Verschiedene Papiertypen; B = Schnellchromatographie; C = andere Versuche; D = Ergebnisse mit den beiden Kieselgelfertigplatten 1500 und 1500 S (mit 5% Stärkezusatz). Tr. = Trennschärfe (Symbole siehe Tabelle III). t = Einzelentwicklungszeit (min) in den LMS Komponenten. * CB. = Hammelcitratblut.

Substanz	LMS	Papiertyp	R_F -Werte	t	Tr.
<i>A</i>					
Protamin	I	2045 a	0.00 0.17 0.32 0.49 0.65 0.85 1.00	15	+++
Protamin	I	Wh. 1	0.00 0.20 0.33 0.48 0.59 0.83 1.00	15	+++
Protamin	I	214	0.00 0.19 0.32 0.46 0.69 0.85 1.00	15	+++
Protamin	I	218	0.00 0.25 0.37 0.59 0.69 0.84 1.00	15	++
Protamin	I	218	0.00 0.20 0.34 0.53 0.66 0.90 1.00	20	+++
Protamin	I	261	0.00 0.19 0.30 0.44 0.70 0.96 1.00	15	++
Protamin	I	261	0.00 0.30 0.50 0.70 0.77 0.92 1.00	20	+++
Protamin	I	289	0.00 0.10 0.23 0.36 0.58 0.90 1.00	10	++
Protamin	I	290	0.00 0.72 0.89	12	+
Serum	I	2045 a	0.00 0.07 0.24 0.43 0.86	15	+++
Serum	I	Wh. 1	0.00 0.10 0.29 0.49 0.82	15	+++
Serum	I	214	0.00 0.08 0.25 0.45 0.95	15	+++
Serum	I	218	0.00 0.05 0.15 0.35 0.95	15	—bis+
Serum	I	218	0.00 0.03 0.30 0.47 1.00	20	+
Serum	I	261	0.00 0.10 0.44	15	—bis+
Serum	I	261	0.00 0.14 0.34 0.57 1.00	20	++
Serum	I	289	0.00 0.07 0.27	10	+
<i>B</i>					
Protamin	I	2040 a	0.00 0.19 0.30 0.47 0.62 0.88 1.00	5	+++
Serum	I	2040 a	0.00 0.11 0.26 0.42 0.96	5	+++
<i>C</i>					
HaCB.	I	2040 a	0.00 0.12 0.28 0.41 0.78	5	+++
Serum	1a	2045 a	0.00 0.14* 0.27* 0.43 0.62 0.95	15	+++
Serum	1a	Wh. 1	0.00 0.09 0.25 0.42 0.54 0.93	15	+++
Serum	1a	214	0.00 0.07 0.21 0.38 0.57 1.00	15	+++
Serum	13	214	0.00 0.10* 0.44* 0.81 0.90	15	+++
Serum	14	214	0.00 0.10* 0.47* 0.85 0.95	15	+++
<i>D</i>					
Protamin	I	1500	0.00 0.08 0.19 0.27 0.38 0.48 0.59	15	++
Protamin	I	1500 S	0.00 0.06 0.15 0.21 0.32 0.45 0.60 0.69 0.80	15	++

* Bande, die auch mit Ölrot O färbbar ist.

graphie (Fig. 2) bringt beim Gradientenverfahren im Gegensatz zu den sonst beobachteten Verhältnissen (wie beim Beispiel der üblichen Aminosäurechromatographie) keine Zeitersparnis (Tabelle IV B, Fig. 3e).

In der Tabelle IV D sind die R_F -Werte von dünnenschichtchromatographischen Trennungen von Protaminen auf den beiden Fertigplatten 1500 (Kieselgel) und 1500 S (Kieselgel mit Stärke als Bindemittel) aufgenommen. Es sei erwähnt, dass auf der 1500-Platte eine Serumentrennung nicht möglich war, während die 1500 S-Platte ein der Papier- bzw. Zellschichtchromatographie analoges Trennungsmuster erbrachte. Eine Serumentrennung auf einer Zellschichtplatte vom Typ 1400 ist in Fig. 2 gezeigt. Wie bereits erwähnt, sind alle Dünnschichtchromatographien nach dem Gradientenverfahren leichter stör anfällig als die Papierchromatographie.

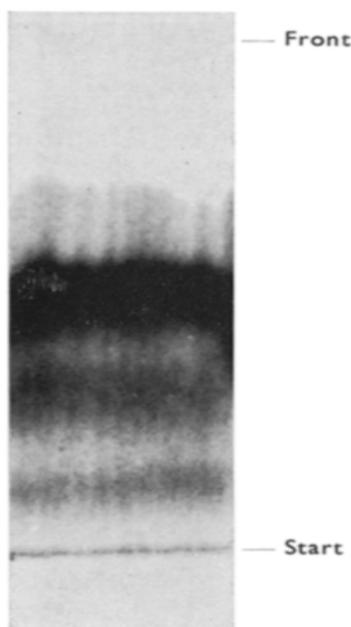


Fig. 2. Gradientenchromatogramm von Kaninchenserum mit dem LMS 1 auf einer Zellschichtplatte (Fertigplatte 1440 der Fa. Schleicher und Schüll).

2. Weitere Ergebnisse

In Tabelle IV C sind die R_F -Werte von Humanserumchromatogrammen mit einem $MgSO_4$ - und einem $(NH_4)_2SO_4$ -Gradienten (LMS 13 und 14, siehe Tabelle I) aufgeführt, ebenso die Chromatographie von Hammelcitratblut in Schnellchromatographie mit dem LMS 1. Die hohen Peaks 1 und 2 (Fig. 3 f) des letzteren Chromatogramms sind durch Haemoglobin verursacht. Versuche, die Fraktionierung von Serum mit dem Salzsäure-Essigsäure-Gradienten zu verbessern, führten zur Abtrennung einer weiteren Komponente (Tabelle IV C) bzw. zur Fraktionierung des Gesamtserums in 5 Komponenten. Das modifizierte Laufmittelsystem, LMS 1 a, enthält eine zusätzliche Laufmittelkomponente: Zwischen die 0.1 N HCl und die 0.01 N HCl ist eine Entwicklung mit 0.05 N HCl eingeschoben. Die Peaks 1 und 2 dieses Chromatogramms färben sich auch mit Ölrot O an (Tabelle IV C).

3. Die kurvenmässige Darstellung von Gradientenchromatogrammen

Eine Auswahl typischer Einzelchromatogramme wurde densitometrisch ausgewertet (siehe Fig. 3–7). Die Bezeichnung der Peaks ist wie folgt: Start: "o" (bei den Histonen im LMS 1: "S", siehe Fig. 5 und Lit. 1 bzw. 2). Übrige Komponenten vom Start zur Front durchnummeriert (Histone im LMS 1-Chromatogramm: A–F, siehe Fig. 5 und Lit. 1 und 2). Komponenten, die erst im Kurvenbild abzugrenzen sind, und auf den Originalchromatogrammen nicht mit Sicherheit erkennbar sind, wurden mit "X" bezeichnet.

DISKUSSION

Bei der Gradientenmethode zur Fraktionierung von Proteinen handelt es sich um eine Anwendung des Aussalz- (bzw. Ausfällungs-)prinzips der Chromatographie^{1,3–5}. Man entwickelt in einem diskontinuierlichen Gradienten fallender Konzentration des Fällungsmittels. Bei den zunächst benutzten höheren Konzentrationen erfolgt Adsorption des grösseren Teils der Proteinkomponenten am Start des Chromatogramms; beim Abfallen der Konzentration werden die einzelnen Komponenten dann nach und nach desorbiert und wandern auf dem Träger¹.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss des Trägers auf den Trenneffekt näher untersucht, nachdem im ersten Teil dieses Aufsatzes¹ eine genaue Beschreibung von Technik und Prinzip und der so erreichbaren Trennungen erfolgte. Hierbei wurden mehrere Linterspapiere sowie zwei Pigment- und ein Glasfaserpapier getestet (Tabelle III und IV A; über Dünnschichten siehe unten). Die Ergebnisse zeigen: 1. dass auch innerhalb der Gruppe der Linterspapiere, die sich chemisch nur unwesentlich unterscheiden sollten, Unterschiede in der Adsorption auftreten; 2. dass auf den Pigment- und dem Glasfaserpapier z.T. gleiche Verhältnisse wie bei der Hauptgruppe der Papiere (2043 b Mgl u.ä.) z.T. auch andere Verhältnisse vorliegen.

Hieraus lässt sich schliessen, dass sowohl chemische als auch physikalische Eigenschaften des Papiers und seiner Oberfläche für den Trenneffekt eines Papiertyps verantwortlich sind.

Ähnlich steht es mit der Anwendung der Gradientenmethode auf Dünnschicht. Hier liefern Zelluloseplatten im allgemeinen dem Papier vergleichbare Auftrennungen, wenn auch mit mehr oder weniger veränderten R_F -Werten. Auf den beiden von uns getesteten Kieselgelschichten ohne Stärkezusatz dagegen ist Blutserum nicht fraktionierbar; es bleibt nahezu ungetrennt und zeigt eine maximale Laufstrecke, die einem R_F -Wert von 0.1 entspricht (Versuche mit LMS 1). Dagegen ist sowohl Salmin (Fa. Serva, Heidelberg; Kieselgel der Fa. Merck, Darmstadt, siehe Lit. 1) als auch unser hier verwendetes pharmazeutisches Protaminpräparat (1500-Platte) auf Kieselgel fraktionierbar. In beiden Fällen lassen sich sogar mehr Komponenten unterscheiden als auf Papier. Interessant ist das Verhalten der 1500 S-Platten, die 5 % Stärke als Bindemittel enthalten. Auf diesen Platten war mit dem LMS 1 auch Humanserum fraktionierbar. Die Auftrennung war der auf 2043 b Mgl oder auf Zelluloseplatten vergleichbar. In diesem speziellen Fall geben die 5 % Stärkezusatz den Kieselgelplatten Eigenschaften einer Zellulosedünnschicht. Neben diesen chemischen, die Zusammensetzung des Adsorbens betreffenden Faktoren sind auch bei den Dünnschichten physikalische Einflüsse im Spiel. So haben wir schon in Lit. 1 auf die Notwendigkeit einer konstanten Plattenherstellung insbesondere im Hinblick auf die

Herstellung der Suspension hingewiesen. Es entscheidet oft über die Möglichkeit oder Unmöglichkeit der Gradientenchromatographie auf dem gleichen Adsorbens, ob die Platten unter Verwendung eines elektrischen Mischgerätes hergestellt und wie lange dabei die Mischzeit gewählt wurde. Abgesehen von den geschilderten Verhältnissen sind alle Dünn- und Dickschichtchromatogramme nach der Gradientenmethode wesentlich störanfälliger als die Papierchromatogramme. Insbesondere ist — wahrscheinlich bedingt durch die Notwendigkeit, die Probe in Form einer durchgehenden Linie aufzutragen — eine gewisse Überlagerung des Trennungsmusters durch Längsstreifen fast nicht zu vermeiden, wodurch besonders quantitative Auswertungen erschwert werden. Wir bevorzugen daher allgemein die Papierchromatographie, umso mehr als die Entwicklungszeiten bei unserer Technik für Papier und Dünnschichten gleich oder bei einem der untersuchten Papiertypen sogar kürzer als bei den Dünnschichten sind (siehe unten).

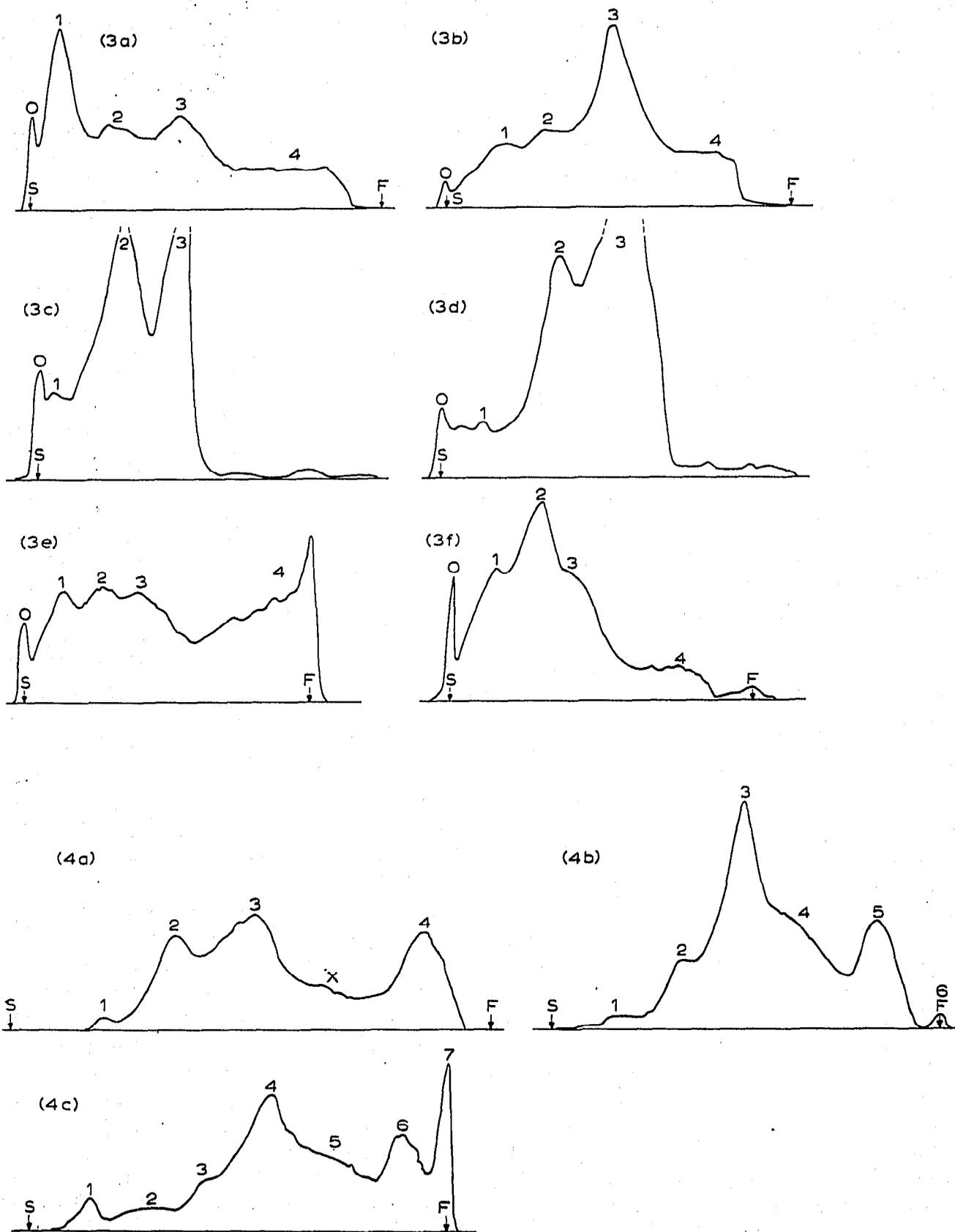
Einer der Vorteile der Gradientenchromatographie von Eiweißstoffen auf Papier liegt in der verglichen mit anderen Methoden sehr kurzen Fraktionierungszeit von nur 75–90 min beim Standardpapier (2043 b Mgl u.ä., siehe Tabelle II und III). Beim Arbeiten mit dem schnellaufenden Papiertyp 2040 a stellten wir fest, dass diese Entwicklungszeit noch auf ein Drittel herabgesetzt werden kann, um Trennungen zu erhalten, die den auf Standardpapieren beobachteten ebenbürtig sind. Die so mögliche *Schnellchromatographie* von Proteinen in nur 25 min (LMS 1) dürfte für zahlreiche Untersuchungen von Vorteil sein. Zum Vergleich sei erwähnt, dass die hochspannungselektrophoretische Fraktionierung unseres Protaminpräparates in der mit der Gradientenchromatographie vergleichbaren Laufzeit von 45 min eine Auftrennung in nur 3 Fraktionen zeigte (Veronalpuffer von pH = 8.6; 2000 V). Andere Methoden benötigen alle ein Vielfaches der für die Gradientenchromatographie erforderlichen Zeit.

Wie in Tabelle IV gezeigt, lassen sich die Lipoproteine des Humanserums mit der Gradientenmethode in zwei Fraktionen zerlegen.

Bei den Blutserumfraktionierungen sei auf die Abgrenzung einer weiteren Fraktion mit dem LMS 1 a hingewiesen, das sich lediglich durch ein langsames Abfallen der HCl-Konzentration von dem von uns viel verwendeten LMS 1 unterscheidet (Tabelle I). Dies weist darauf hin, dass mit einem mehr kontinuierlichen Gradienten auch in anderen Fällen eine Verbesserung der Fraktionierung erwartet werden könnte. Wir haben jedoch bisher davon abgesehen, einen echten kontinuierlichen Gradienten zu verwenden. Sind doch schon bei einer Menge von 100 cm³ Entwicklungsflüssigkeit beim LMS 1 in 75 min (bzw. in 25 min) Flüssigkeitsmengen von etwa 10 l strömungsfrei in das Entwicklungsgefäß zu überführen, zu mischen und aus ihm wieder zu entnehmen. Die sich hieraus ergebende unnötige Kompliziertheit der Anordnung liess uns bisher bei den diskontinuierlichen Systemen bleiben.

Der nächste Schritt bei der Gradientenchromatographie von Blutserum und eventuell auch von Vollblut (Fig. 3f) muss jetzt sein, Elektropherogramm und Gradientenchromatogramm (gegebenfalls mit verschiedenen LMS entwickelt) von Normalserum und von Seren von Patientenkollektiven mit gleichen Diagnosen miteinander zu vergleichen. Es sei dabei wieder an die vorteilhaft kurze Fraktionierungszeit der Gradientenchromatographie erinnert, die sich bei klinischen Untersuchungen sehr günstig auswirken würde. Jedoch sind hierzu noch ausgedehnte Voruntersuchungen erforderlich.

Für diese und für die meisten anderen denkbaren Untersuchungen ist eine



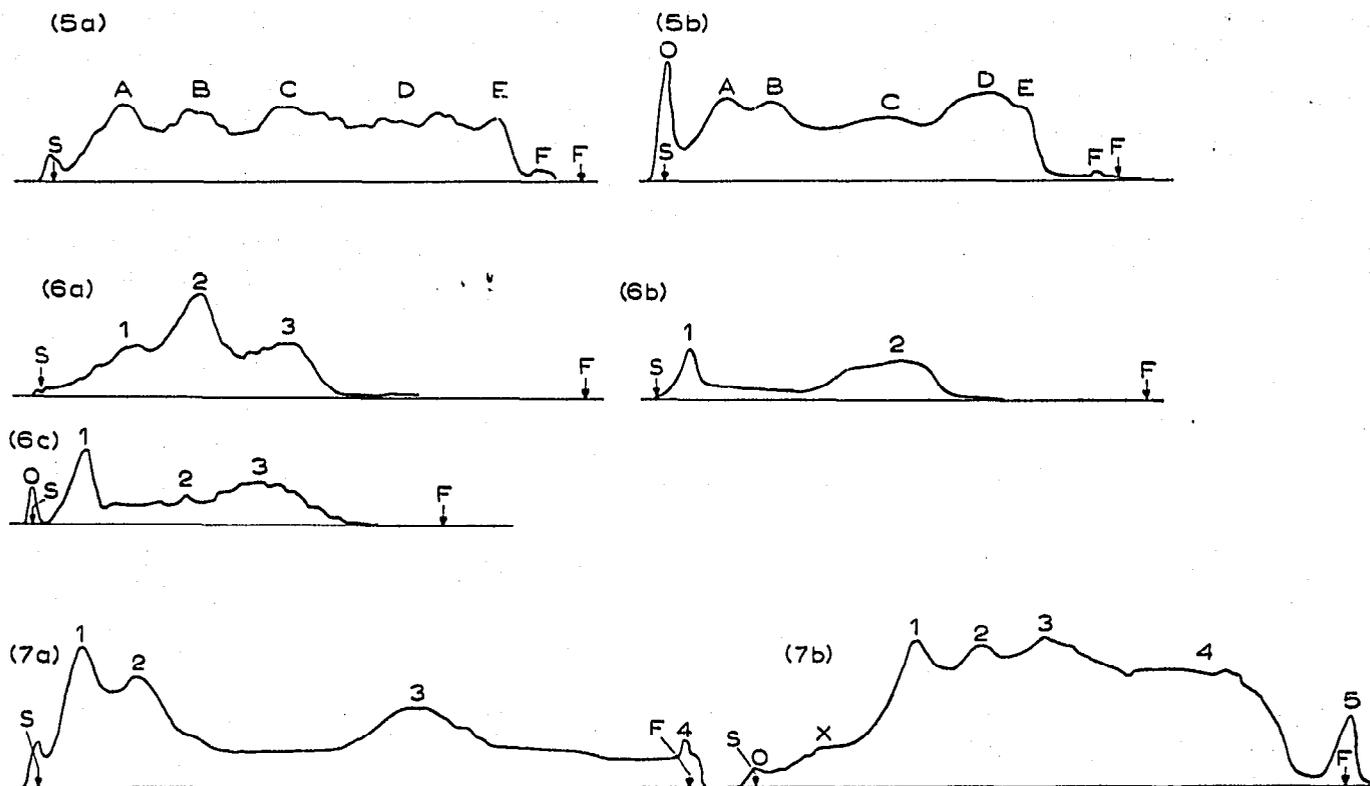


Fig. 3-7. Kurvendarstellung typischer Gradientenchromatogramme mit verschiedenen Proteinen und Nucleinsäuren. Falls nichts anderes angegeben, sind die Chromatogramme auf 2043 b Mgl gelaufen und mit Amidoschwarz 10 B gefärbt. Die Peaks sind vom Start bis zur Front durchnummeriert. Die über dem Start gelegenen Peaks sind mit "O" bezeichnet. S = Start; F = Front. Über die abweichende Nomenklatur der Histonchromatogramme mit dem LMS 1 siehe Fig. 5. Banden, die erst im Kurvenbild zu erkennen sind, tragen die Bezeichnung "X"; Banden, die andererseits im Kurvenbild ungenügend abgesetzt erscheinen, sind mitnummeriert.

Fig. 3. Serumchromatogramme. In 3a Standardbild eines menschlichen Blutserums in LMS 1-Chromatogramm. Zum Vergleich in 3b ein typisches Chromatogramm eines Kaninchenserums mit dem charakteristischen hohen Peak 3 (siehe auch Fig. 2), 3c und 3d: Humanserum auf 214 mit LMS 13 und 14 entwickelt. 3e: Schnellchromatographie einer weiteren menschlichen Serumprobe mit LMS 1 auf 2040 a. Starke Papierbeladung führt zu dem in der Front liegenden Peak 4 (siehe Lit. 1). 3f: Schnellchromatographie von Hammelcitratblut mit dem LMS 1 auf 2040 a. Der hohe Peak 2 sowie Peak 1 enthalten Haemoglobin.

Fig. 4. Protamine. 4a: Ein kommerzielles Präparat der Fa. Serva, Heidelberg (bezeichnet als Salmin) im LMS 1-Chromatogramm. 4b: Ein pharmazeutisches Protaminpräparat (LMS 1). Es handelt sich um das in Lit. 1 beschriebene, in der vorliegenden Arbeit zur Papiertestung verwendete Präparat. Ein weiteres, ebenfalls pharmazeutisches Protaminpräparat (PP2), das wir untersuchten, zeigte nur die Peaks 1, 2 und 3 (siehe auch Fig. 1). 4c: Das gleiche Protamin wie in 4b im LMS 12¹-Chromatogramm (siehe auch Lit. 1).

Fig. 5. Histone. In 5a und 5b Histone aus Kaninchenmilz bzw. dem Walkercarcinosarkom der Ratte im LMS 1-Bild unter Angabe unserer Nomenklatur der Banden bzw. Peaks (siehe auch Lit. 1 und 2).

Fig. 6. Sonstige Proteine. In 6a und 6b LMS 1-Chromatogramme zweier verschiedener pharmazeutischer Insulin-Depotpräparate. Altinsulin ergibt nur den Peak 3. 6c: LMS 1-Kurve eines LDH-Präparates aus Kaninchenmuskel (Fa. Boehringer, Mannheim).

Fig. 7. Ein kommerzielles Präparat von "hochmolekularer RNS" (a) und von s-RNS im LMS 3¹- bzw. LMS 8¹-Chromatogramm. Toluidinblaufärbung.

quantitative Auswertung der Chromatogramme nötig. Da wir aus technischen Gründen mit strichförmigen Auftrag arbeiten und die resultierenden Chromatogramme daher den Elektropherogrammen sehr ähnlich sind, ist die Auswertung in den — z.B. in klinischen Laboratorien — üblichen Densitometern ohne weiteres möglich. In den Fig. 3–7 zeigen wir eine Auswahl von typischen Einzelchromatogrammen in Kurvendarstellung. Es zeigt sich hierbei, dass im densitometrischen Bild manchmal Komponenten sichtbar werden, die im Originalchromatogramm nicht mit Sicherheit erkennbar sind (Fig. 4a, 7b; die zusätzlichen Komponenten sind in den betreffenden Abbildungen durch ein "X" gekennzeichnet). Wir halten die Kurvendarstellung der Gradientenchromatogramme für die optimale.

DANK

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

Das benutzte Densitometer wurde freundlicherweise von den Herren Prof. Dr. W. KUHN und Dr. F. KNÜCHEL, Heidelberg, Fachklinik Königsstuhl, zur Verfügung gestellt, denen an dieser Stelle nochmals herzlich gedankt sei.

Die Firmen Schleicher und Schüll, Dassel, und Macherey und Nagel, Düren, haben dem Autoren Muster ihrer Papiere und Dünnschichtfertigplatten überlassen. Auch ihnen gebührt sein besonderer Dank.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über den Einfluss der Trägermaterialien auf die papier- und dünn-schichtchromatographische Fraktionierung von Proteinen nach einer kürzlich beschriebenen Methode berichtet.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Ausfällungschromatographie. Das Chromatogramm wird nach speziellem Auftragen der Probe in einem diskontinuierlichen Salz- oder Säuregradienten fallender Molarität entwickelt. Es lassen sich so u.a. Serumproteine, basische Proteine (Histone und Protamine) und Nucleinsäuren (RNS und Polyadenylsäure) in ihre Komponenten zerlegen.

In der vorliegenden Arbeit wird über die Eignung mehrerer Papiertypen berichtet. Mit dem Typ 2040 a (Fa. Schleicher und Schüll, Dassel) lässt sich eine Fraktionierung besonders schnell, in nur 25–30 min durchführen; bei Verwendung einer Reihe von Standardpapiersorten sind 75–90 min erforderlich.

Eine Anzahl typischer Einzelchromatogramme von Serum, Histonen, Protaminen, pharmazeutischen Insulinpräparaten und von RNS ist densitometrisch dargestellt.

Die Methode erlaubt die technisch sehr einfache Fraktionierung einer grösseren Zahl von Proteinen und Nucleinsäuren (vornehmlich RNS) in vergleichsweise sehr kurzer Zeit.

LITERATUR

- 1 K. BAUER, *J. Chromatog.*, 32 (1968) 529.
- 2 K. BAUER UND P. BEHEIM, *Z. Krebsforsch.*, 69 (1967) 230.
- 3 A. TISELIUS, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 26 B, No. 1 (1948).
- 4 A. TISELIUS, *Naturwiss.*, 37 (1950) 25.
- 5 A. TISELIUS, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 245.

Weitere Literatur siehe Lit. 1.