

CHROM. 4191

Elektrophorese und Anfärbbarkeit von synthetischen Peptiden

Zur Auftrennung von Protein-, Peptid- und Aminosäure-Gemischen werden die Papier-, Cellogel-, Stärke- und Polyacrylamid-Gel-(PAG)-Elektrophorese verwendet. Besonders PAG-Elektrophorese zeichnet sich durch ein hohes Auflösungsvermögen aus. Diese Methode wurde bisher nur zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen eingesetzt. Über die PAG-Elektrophorese von Peptiden wurde noch nicht berichtet. PAG-Elektrophorese wird bei uns zur Trennung von Casein-Fractionen eingesetzt¹.

Aus der Elektrophorese und Anfärbung einiger Modellpeptide (Tabelle I) auf verschiedenen Trägern sollte eine geeignete Elektrophorese-Methode zur Untersuchung von kürzerkettigen Peptiden entwickelt werden.

Experimenteller Teil

Modellpeptide. Die in Tabelle I aufgeführten Peptide wurden nach der Festphasen-Methode^{2,3} synthetisiert.

Polyacrylamid-Gel-(PAG)-Elektrophorese (Lit. 4-8). PAG-Elektrophorese wurde nach der früher beschriebenen Methode¹ in der Zelle nach Lit. 9 ausgeführt.

Für die Herstellung des Gels wurde folgender Ansatz verwendet: 4.275 g Acrylamid; 0.225 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid; 30 ml Trispuffer; 2 Tropfen N,N,N',N'-Tetramethyldiamin; 2 Tropfen 10%ige wässrige Ammoniumpersulfatlösung. Das Gel enthält 15% Acrylamid. Für eine 2 mm dicke Gelplatte vom Format 10 × 20 cm musste die dreifache Menge der Reagenzien verwendet werden.

Zusammensetzung des Trispuffers (pH = 8.2-8.4): 6.0 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, 28.8 g Glycin und 300 g Harnstoff mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen.

Puffer für die Elektrophoresekammern (pH = 8.2-8.4): 6.0 g Tris-(hydroxy-

TABELLE I

ANFÄRBUNG VON SYNTHETISCHEN PEPTIDEN MIT AMIDOSCHWARZ 10 B AUF CELLOGEL-TRÄGERFOLIEN

Nr.	Peptide	Anfärbung ^a	
		Amidoschwarz 10 B	Ninhydrin- Cd-Acetat
1	Glu-Lys	+	+
2	Met-Glu-Lys	+	+
3	Ala-Ser-Phe	-	+
4	Ala-Thr-Phe	-	+
5	Ser-Pro-Pro-Pro-Gly	-	+
6	Asp-Ile-Ala-Met-Glu-Lys	+	+
7	Glu-Asp-Ile-Ala-Met-Glu-Lys	+	+
8	Val-Ser-Glu-Glu-Glu-Asp-Ile-Ala-Met-Glu-Lys	+	+
9	Val-Ser-Ile-Glu-Glu-Glu-Ser-Ser-Pro-Ser-Val-Glu-Glu-Glu-Asp-Ser-Ile-Ala	-	+
10	Lys-Asp-Glu-Glu-Glu-Glu-Val-Glu-Ser-Phe-Ser-Gly-Pro-Asp-Ala-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly	+	+

^a Nach vorhergehender Hitze-fixierung am Träger. + = angefärbt; - = nicht angefärbt.

methyl)-aminomethan und 28.8 g Glycin mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen.

Die Lösungen der Peptide und des entfetteten Käses wurden vor der Aufgabe auf die PAG-Träger mit Rohrzucker und einem Tropfen Bromphenolblau in 40%iger Rohrzucker-Lösung versetzt. Bei einer Stromstärke von 30 mA liess man die Proben 1/2 h einziehen und stellte dann für 3 h auf 50–60 mA.

Von den in Tabelle I angegebenen Peptiden wurden jeweils 10, 20, 30, 50 und 100 μ l einer 10, 20, 30 und 50%igen Lösung im Trispuffer aufgetragen. Von der 10%igen Lösung des entfetteten Käses in Trispuffer wurden 20 μ l aufgegeben. Nach der Elektrophorese wurde 15 min in einer 0.5%igen Amidoschwarz 10 B Lösung in 7.5%iger wässriger Essigsäure angefärbt. Als Entfärber verwendeten wir 10%ige wässrige Essigsäure. Nach dieser Methode wurde nur der Käseextrakt angefärbt.

Versuche zur Fixierung der Peptide im Gel

Um das Auswaschen der Peptide bzw. der Peptidfarbstoff-Komplexe aus dem Gel zu verhindern, wurden dem Farbbad und dem Entfärber 10% Perchlorsäure, 10% Trichloressigsäure, 10% Sulfosalicylsäure, 10% Phosphorwolframsäure oder Methanol bis zu 90% zugegeben. Das Gel wurde auch 15 min in Glycerin gelegt und danach 2 h bei 110° erhitzt. Trotz dieser Behandlungen konnten die Peptide mit Amidoschwarz 10 B nicht angefärbt werden.

Cellogel-Elektrophorese (Lit. 10 und 11). Bei der Cellogel-Elektrophorese wurden Cellogel-Streifen (Chemetron, Milano (Italien)) vom Format 4 \times 17 cm verwendet. Die Elektrophorese wurde während 15 min bei einem Spannungsgefälle von 30 V/cm in dem Puffer Pyridin–Eisessig–Wasser (25:1:225) (pH = 6.5) ausgeführt.

Die Cellogel-Streifen wurden auf Glasplatten aufgelegt, welche auf dem Kühlblock der Elektrophoresekammer lagen. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ l einer 30%igen Peptidlösung bzw. einer 10%igen Lösung des Käseextraktes.

Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B (Lit. 12). Die Cellogel-Streifen wurden nach der Elektrophorese 5 min in ein Färbebad aus 0.5% Amidoschwarz 10 B in Methanol–Eisessig (90:10) gelegt und danach in einer Lösung von Methanol–Eisessig (90:10) entfärbt. Keines der Modellpeptide (Tabelle I) konnte auf diese Weise angefärbt werden. Nur die Proteinzonen des Käseextraktes wurden angefärbt.

Fixieren auf dem Cellogel-Träger. Die Zugabe folgender Eiweissfällungsmittel^{13–18} zu der Farblösung und dem Entfärber zeigte keinen Erfolg: Perchlorsäure, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure, Salicylsäure, Phosphorwolframsäure; jeweils 10%ig. Behandelt man die Cellogel-Folien nach der Elektrophorese jedoch 2–3 min bei 110°, so werden die lysin-haltigen Peptide mit Amidoschwarz 10 B in essigsäurem Methanol angefärbt (Fig. 1). Beim Käseextrakt treten nach Hitze-fixierung keine zusätzlichen Banden auf.

Anfärbung mit dem Ninhydrin–Cd-Acetat-Reagens (Lit. 19). Zusammensetzung des Reagens: 0.2 g Cd-Acetat; 10 ml Eisessig; 100 ml Methanol; 10 ml Wasser; 1 g Ninhydrin.

Die Cellogel-Streifen werden nach der Elektrophorese 2–3 min auf 110° erhitzt und durch die Ninhydrin–Cd-Acetat-Lösung gezogen. Die Streifen werden 2 h über konz. H₂SO₄ aufbewahrt, worauf sich rot gefärbte Zonen abzeichnen beginnen. Die Farbentwicklung kann durch Erwärmen der Streifen auf 60° beschleunigt werden. Nach dieser Methode können sämtliche Peptide angefärbt werden.

Papierelektrophorese (Lit. 20). Für die Papierelektrophorese auf Schleicher &

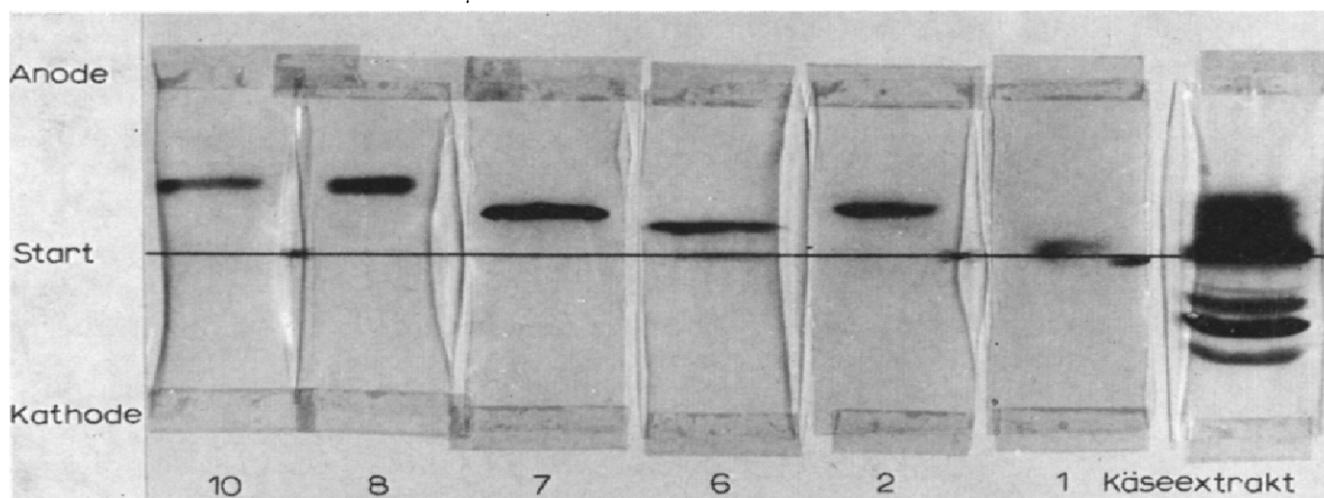


Fig. 1. Cellogel-Elektrophorese und Amidoschwarz 10 B Anfärbung nach vorhergehender Hitze-fixierung von synthetischen Peptiden (Nummern aus Tabelle I).

Schüll-Papier 2043 a Mgl (3 × 30.6 cm) galten die gleichen Bedingungen wie bei der Cellogel-Elektrophorese, jedoch waren die Peptidbanden vergleichsweise breiter und diffuser. Der Käseextrakt wurde nicht aufgetrennt.

Ergebnisse

PAG-Elektrophorese. Keines der synthetischen Peptide konnte auf Polyacrylamid-Gel angefärbt werden. Die Peptidfarbstoff-Komplexe sind in den wässrigen Farblösungen und Entfärbern zu gut löslich und werden vollständig ausgewaschen. Auch der Zusatz von Eiweissfällungsmitteln¹³⁻¹⁸ zum Polymerisationsgemisch des PAG, zu den Farbbädern und Entfärbern brachte keine Anfärbung der Peptide, obwohl z.B. das Eicosapeptid und das Undecapeptid (Tabelle I) aus wässriger Lösung mit Trichloressigsäure ausgefällt werden können. Organische Lösungsmittel, wie Methanol oder Methanol-Eisessig-Gemische, bewirken eine starke Schrumpfung des Gels und können deshalb nicht für Farblösungen oder Entfärber benutzt werden. Unsere Versuche mit PAG-Elektrophorese ergaben, dass Peptide mit einer Kettenlänge von 2–20 Aminosäuren nach dieser Methode nicht sichtbar gemacht werden können; hingegen werden die Proteinkomponenten eines Käseextraktes auf PAG mit Amidoschwarz gut angefärbt.

Cellogel-Elektrophorese. Mit Amidoschwarz konnten auch auf Cellogel-Trägern die Modellpeptide in Methanol-Eisessig-Lösung vorerst nicht angefärbt werden. Der Zusatz von Eiweissfällungsmitteln zu den Farblösungen und Entfärbern zeigte keinen Effekt.

Mit der Ninhydrin-Cd-Acetat-Färbemethode konnten alle Peptide angefärbt werden. Bei dieser Technik wird der Cellogel-Streifen nach der Elektrophorese bei 110° kurz getrocknet, durch die Ninhydrin-Cd-Acetat-Lösung gezogen und dann über konz. Schwefelsäure oder im Trockenschrank entwickelt.

Erhitzt man die Cellogel-Folie nach der Elektrophorese und färbt mit Amidoschwarz 10 B ein, so können nur die lysin-haltigen Peptide angefärbt werden (Fig. 1). Peptide, die kein Lysin enthalten, werden auf Cellogel nur vom Ninhydrin-Cd-Acetat-Reagens angefärbt.

Die Fixierung der Peptide am Cellogel-Träger kann also nur durch Hitzebe-

handlung erfolgen. Im Falle des Käseextraktes treten beim Erhitzen des Streifens vor der Anfärbung keine zusätzlichen Banden auf.

Papierelektrophorese. Durch Papierelektrophorese wird eine sehr schlechte Auftrennung des Käseextraktes erreicht. Auch die Modellpeptide ergaben auf Papier breite und diffuse Banden. Eine Hitzefixierung der Peptide auf Papier war für die Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B unbedingt notwendig. Wie aus früheren Versuchen hervorgeht, können schon Aminosäuren nach Hitzefixierung am Papier angefärbt werden.

Diskussion

Bisher wurde für die elektrophoretische Auftrennung des Käseextraktes die PAG-Elektrophorese angewandt. Es war dabei nicht sicher, ab welcher Kettenlänge Peptide überhaupt erfasst wurden. Durch unsere Untersuchungen an Modellpeptiden konnte bewiesen werden, dass bei der PAG-Elektrophorese Peptide mit 20 oder weniger Aminosäureresten im Molekül nicht erfasst werden. Ab welcher Kettenlänge Peptide auf Polyacrylamid-Gel angefärbt werden können, kann noch nicht gesagt werden, da Peptide mit mehr als 20 Aminosäuren im Molekül nicht zur Verfügung standen.

Für die Anfärbbarkeit von Peptiden mit Amidoschwarz scheint deren Lysin-gehalt eine wesentliche Rolle zu spielen. Peptide, die kein Lysin enthalten, können selbst nach Hitzefixierung auf Cellogel- oder Papier-Trägern nicht angefärbt werden. Mit dem Ninhydrin-Cd-Acetat-Reagens sind jedoch alle Peptide nachweisbar.

Herrn J. FLEISCHER danken wir für fleissige und gewissenhafte Mitarbeit.

Unilever Forschungslaboratorium Hamburg,
Hamburg 50 (B.R.D.)

K. P. POLZHOFFER
K. H. NEY

- 1 K. H. NEY, I. P. G. WIROTAMA UND I. SEITZ, 17. *Int. Milchwirtsch. Kongr., München*, 1966, Bd. D, S. 283.
- 2 R. B. MERRIFIELD, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 2149.
- 3 R. B. MERRIFIELD, *Biochemistry*, 3 (1964) 1385.
- 4 L. ORNSTEIN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 321.
- 5 B. J. DAVIES UND L. ORNSTEIN, *J. Histochem. Cytochem.*, 7 (1959) 291.
- 6 B. DOWDING UND A. L. TARNOKY, *Proc. Assoc. Clin. Biochem.*, 4 (1967) 167.
- 7 S. RAYMOND UND Y. WANG, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 391.
- 8 A. CHRAMBACH, R. A. REISFELD, M. WYCKOFF UND J. ZACCARI, *Anal. Biochem.*, 20 (1967) 150.
- 9 P. AKROYD, *Anal. Biochem.*, 19 (1967) 399.
- 10 M. A. NAUGHTON, F. SANGER, B. S. HARTLEY UND D. C. SHAW, *Biochem. J.*, 77 (1960) 149.
- 11 R. O. BRIERE, T. GOLIAS UND J. G. BATSAKIS, *Am. J. Clin. Pathol.*, 44 (1965) 695.
- 12 A. H. GORDON, B. KEIL, K. SEBESTA, O. KNESSEL UND F. SORM, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 15 (1950) 1.
- 13 B. KEIL UND Z. SORMOVA, *Laboratoriumstechnik für Biochemiker*, Akademie Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1965.
- 14 H. NETTER, *Theoretische Biochemie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959.
- 15 P. KARLSON, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1961.
- 16 E. ÜHLEIN, *Umschau*, (1956) 743.
- 17 R. P. BODNARYK UND L. LEVENBOOK, *Biochem. J.*, 110 (1968) 771.
- 18 K. MELLA, E. TH. FÖLSCH, H. J. TORFF UND G. PFLEIDERER, *Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 891.
- 19 J. HEILMANN, J. BAROLLIER UND E. WATZKE, *Z. Physiol. Chem.*, 309 (1957) 219.
- 20 L. MICHAELIS, *Biochem. Z.*, 16 (1909) 81.

Eingegangen am 29. Mai 1969