

CHROM. 5170

PRÄPARATIVE TRENNUNG VON PROTEINGEMISCHEN DURCH SEPHADEXGELFILTRATION BEI GLEICHZEITIGER EINWIRKUNG VON GLEICHSTROM (RETARDATIONSFILTRATION)

G. BUNDSCHUH*

Instituto de Hematología y Inmunología, Hospital Nacional, La Habana, Altahabana (Cuba)

(Eingegangen am 17. November 1970)

SUMMARY

Preparative separation of protein mixtures using Sephadex gel filtration with simultaneous application of continuous current (electroretardation-filtration)

A method is described in which the proteins of human serum are, in one step, separated into thirteen fractions. By this technique, bovine haemoglobin is separated into two different fractions. In this procedure a column especially built for this purpose, which contains coarse Sephadex, is utilised. The principles underlying the function of this column are described in detail. The additional fractions result from coincidental action of continuous current. Because the normal filtration mobility of the protein molecules is greater than the electrophoretic mobility, the electrode of the upper-side must be connected so as to serve as the anode, so that at alkaline pH the forces of separation work in opposite directions. In this way, different degrees of retardation for most protein molecules result from their dependence upon electrical potential. We shall call this method of separation "electroretardation-filtration". To obtain optimal separation of the protein mixture, it is necessary to work at low V_e/h , though it is possible that some proteins may ascend into the anode buffer. In order to examine the direction of mobility we have calculated a quotient (E/W-quotient) from V_e/h (ml) and the power (Watts) of the gel bed. Empirical observation indicates that an E/W-quotient of more than 0.15 guarantees the elution of most serum proteins.

Using monospecific antisera, several peaks are identified. Upon immunoelectrophoretic analysis, fractions which contain albumin give an atypical pattern consisting of two or possible three components. IgG is found in two different, remotely separated peaks.

EINLEITUNG

Nach Einführung der Sephadexgelfiltration als Laboratoriumstechnik wurde sehr bald eine Kombination der Gelfiltration mit der Elektrophorese erprobt. In den

* Adresse nach dem 1. Juli 1971: Humboldt Universität, Hannoversche Strasse 6, 104 Berlin, D.D.R.

ersten Arbeiten verwendeten die Autoren eine zweidimensionale Technik—Filtration in der ersten Dimension, elektrophoretische Trennung in der zweiten Dimension¹⁻⁵. Eine nachfolgende Auftrennung der durch Gelfiltration gewonnenen Protein- oder Enzymfraktionen durch Säulenelektrophorese auf Sephadex G-25 beschreiben GELOTTE *et al.*⁶ sowie LOONTIENS UND DE BRUYNE⁷. Über eine Serumfraktionierung durch Säulenelektrophorese auf Sephadex G-25 berichtet PORATH⁸. Säulen für derartige Trennungen werden von LKB sowie der Fa. Larsson, Schweden, hergestellt⁸.

Präparative Proteintrennungen durch Säulenelektrophorese wurden bereits von verschiedenen Untersuchern⁹⁻¹² durchgeführt. Als Trägermedium benutzten diese Autoren jedoch Zellulose (siehe auch LAURELL¹³). Eine Literaturübersicht zu dieser als "Elektrochromatographie" bezeichneten Technik bis 1960 gibt WUNDERLY¹⁴. Referenzen zu nachfolgenden Arbeiten siehe bei SCHULTZE UND HEREMANS¹⁵.

Nachdem die von RAYMOND UND WEINTRAUB¹⁶ eingeführte Acrylamidgелеlektrophorese zur Routinepraxis geworden war, beschäftigten sich verschiedene Arbeiten mit der präparativen Säulenelektrophorese unter Verwendung dieses Trägermediums¹⁷⁻²². Werden, wie in den letztgenannten Arbeiten fixe Gele zur Säulenfüllung verwendet, so kann der Elutionspuffer das Gel nicht in seiner gesamten Länge durchströmen, sondern muss am Boden der Säule zugeleitet werden. Spezielle Kolonnen für diese Zwecke wurden von verschiedenen Autoren²³⁻²⁶ beschrieben und kommerziell von Shandon, England und von Büchler Instruments Inc., Fort Lee, N.J., U.S.A. angeboten.

Während der Manuskriptniederschrift erhalten wir Kenntnis von der Arbeit von NERENBERG UND POGOJEFF²⁷, die sich mit der gleichen Aufgabenstellung beschäftigten, wie sie in unserer Arbeit beschrieben werden soll. Die genannten Autoren beschränkten jedoch bezüglich der Säulenkonstruktion einen anderen Lösungsweg als wir.

BESCHREIBUNG DES VERFAHRENS

Die Kombination einer Sephadexgelfiltration auf grobmaschigen Gelen mit der gleichzeitigen Einwirkung von Gleichstrom auf das zu trennende Proteingemisch wurde in der Absicht einer eventuellen Vergrößerung des Probevolumens erprobt, beziehungsweise einer zusätzlichen Fraktionierung der Proteinkomponenten der einzelnen peaks, die bei der herkömmlichen Sephadexgelfiltration entstehen.

Um die Trennwirkung beider Kraftqualitäten (Filtration und Einwirkung der Gleichspannung auf die geladenen Teilchen) voll auszunutzen, schien es zweckmässig, die Kräfte entgegen gerichtet wirken zu lassen. Der die gesamte Säule von oben her durchströmende Puffer spült die Proteinmoleküle des Probevolumens nach dem Prinzip der Gelfiltration aus der Säule heraus und trennt sie, abhängig vom verwendeten Sephadex Typ, in Gruppen auf; das zur selben Zeit einwirkende Gleichstromfeld realisiert eine zweite Auftrennung nach dem Prinzip der Elektrophorese. Da die meisten Serumproteine im alkalischen pH Bereich anodisch wandern, wurde bei der Auftrennung von Serum und Hämoglobinlösung die Elektrode am oberen Säulenende als Anode gepolt. Die Elektroden wurden aus Platin gefertigt, um die Elektrodenschaltung je nach Bedarf verändern zu können. Die elektrophoretische Mobilität der Proteinmoleküle ist wesentlich geringer als ihre normale Filtrationsgeschwindigkeit im Sephadexgel vom coarse Typ.

Filtration und Elektrophorese greifen bei der Trennung eines Proteingemisches an physikalisch verschiedenen Eigenschaften der Proteinmoleküle an: Während die Filtration ausschliesslich die Molekülgrösse der Sphäroproteine berücksichtigt, eine sogenannte Gruppentrennung bewirkt, ist für den elektrophoretischen Trennvorgang vorwiegend die Ladung der Teilchen im Verhältnis zu ihrer Molekülgrösse ausschlaggebend, erst in zweiter Linie ihre Architektur, wenn auch hier von der fibrilären Struktur abgesehen wird. Die Eiweisskörper mit der relativ grösseren negativen Ladung haben das Bestreben, schneller anodisch zu wandern als die weniger negativ geladenen. Im konkreten Fall streben sie in der Säule aufwärts. Das anliegende Gleichstromfeld bewirkt aber keine Fortbewegung der Teilchen im Sinne ihres elektrischen Potentials (Elektrophorese), sondern, da der abwärts gerichtete Filtrationsstrom einen schnelleren Abtransport der Teilchen bewirkt als das Gleichstromfeld, wird durch die anliegende Spannung lediglich eine Verzögerung der negativ geladenen Teilchen in ihrer abwärts verlaufenden Filtration erreicht, die von ihrem elektrischen Potential abhängig ist und als "Elektroretardation" bezeichnet werden kann. Erst bei Verminderung der Filtrationsgeschwindigkeit unter die Grenze der elektrophoretischen Mobilität der Teilchen bewirkt die dann wirksam werdende Elektrophorese ein Aufsteigen der Fraktionen in der Säule. Die Elution der getrennten Fraktionen ist im vorliegenden Fall jedoch an eine aus beiden Trennkräften resultierenden, abwärtsgerichteten Bewegung der Eiweisskomponenten gebunden (siehe Fig. 1).

BESCHREIBUNG DER SÄULE

Die Realisierung der dargelegten Aufgabe war an die Konstruktion eines besonderen Säulenauslaufes gebunden. Da sich Plexiglas mechanisch leicht bearbeiten lässt, wurden die ersten Versuche mit einer im Laboratorium gefertigten Plexiglas-

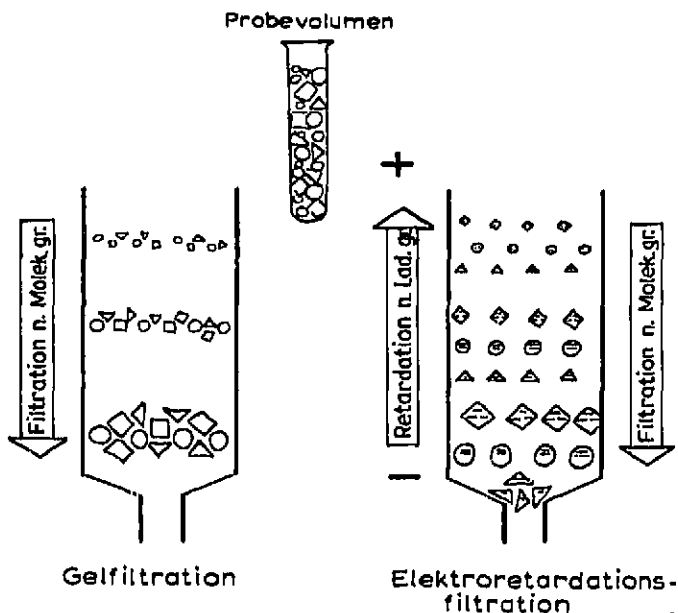


Fig. 1. Schematische Darstellung des Prinzips der Gelfiltration im Vergleich zur Elektroretardationsfiltration, bei der eine zusätzliche Auftrennung der Proteingruppen in Abhängigkeit vom elektrischen Potential der Proteinmoleküle erfolgt. Je nach Ladungspotential werden die Anionen schwächer oder stärker im Gelbett retardiert.

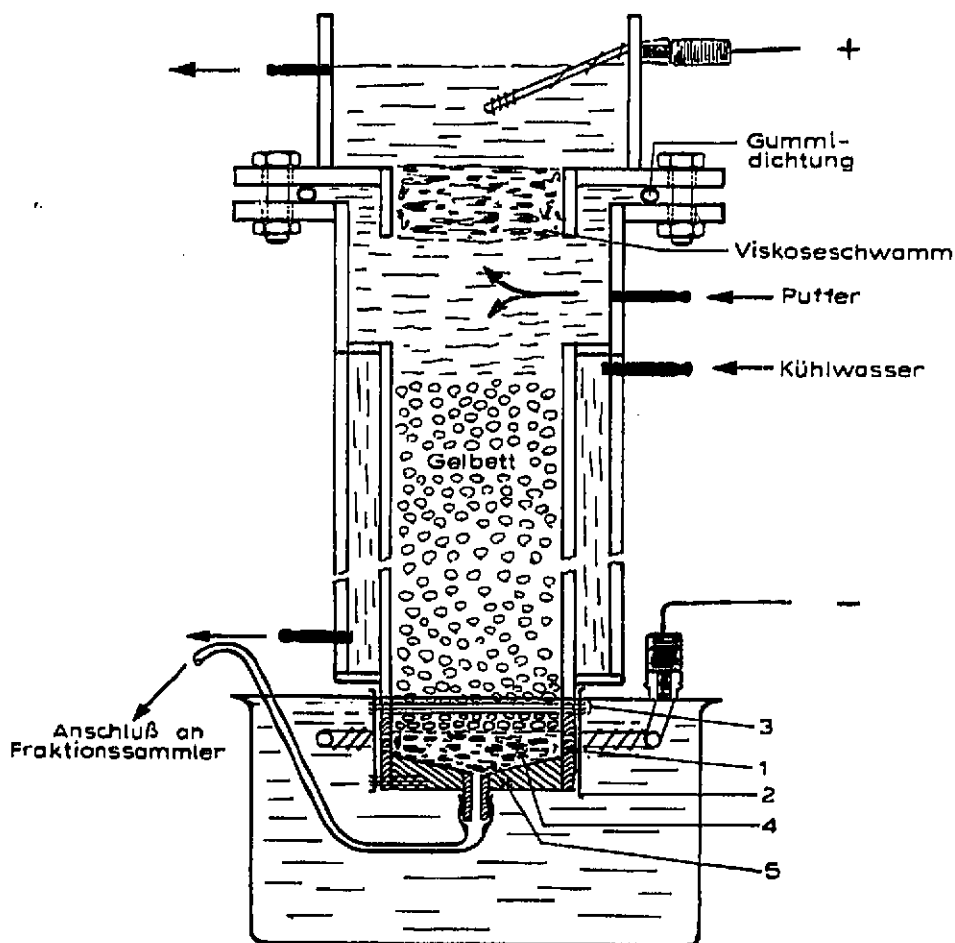


Fig. 2. Schematische Darstellung der für die Versuche verwendeten Säule (Plexiglasmodell). (1) Bohrungen von 2 mm \varnothing in der Säulenwandung zur Kontaktherstellung zwischen Gelbett und Elektrodenpuffer (nähere Beschreibung siehe Text); (2) Dialysierschlauch, die Bohrungen (1) von aussen abdichtend; (3) Nylonfäden zur Verschnürung der Dialysiermembran auf dem Säulenmantel; (4) Viskoseschwamm zur Verhinderung des Auslaufens von Sephadexgel; (5) Im Säulenmantel fixierte Bodenplatte mit Elutionsstutzen und Verbindungsschlauch zum Kollektor.

säule durchgeführt. Von allen erprobten Varianten erwies sich die in Fig. 2 gezeigte Lösung am vorteilhaftesten. Der Boden der Säule wird durch eine leicht kegelförmig ausgedrehte und mit einem Auslaufstutzen versehene Bodenplatte fest verschlossen. Oberhalb dieser Platte befinden sich im Mantel der Säule insgesamt 50 Bohrungen von 2 mm Diameter in zwei Reihen übereinander angeordnet, die von aussen durch eine Dialysiermembran verschlossen werden. Die Kontaktgebung des Gelbettes mit dem Kathodenpuffer erfolgt durch die Bohrungen. Die Dialysiermembran verhindert das Auslaufen der getrennten Fraktionen in den Puffer.

Die Konstruktion des oberen Säulenendes mit dem aufmontierten Puffergefäss ist aus Fig. 2 ersichtlich. Wichtig ist die Trennung des Anodenpuffers von jenem Puffer, der das Gelbett durchströmen soll (Elutionspuffer). Ist diese Trennung unzureichend, so treten mit dem Anodenpuffer die darin gelösten, durch die Elektrolyse entstandenen Gasmoleküle in das Gelbett ein und zerstören es durch Bläschenbildung. Die Trennung beider Puffer liess sich in der Weise erreichen, dass zwischen beiden ein Viskoseschwamm montiert wurde, an dessen Oberfläche sich abwärts-

strömende Gasmoleküle adsorbieren. Der Zulauf des Elutionspuffers erfolgt unterhalb dieses Schwammes. Die zuströmende Puffermenge sollte geringfügig grösser sein, als das in der gleichen Zeit die Säule durchströmende Elutionsvolumen, so dass ein geringer Teil des zuströmenden Puffers in das Elektrodengefäss aufsteigt und durch einen Überlauf abfließen kann. Nach erfolgreicher Erprobung des Plexiglasmodelles wurde eine entsprechende Glaskolonne angefertigt*.

SEDIMENTATION DES GELBETTES

Die Montage der Dialysiermembran am unteren Säulenende erfolgt durch Umschnüren mit Nylonfaden (Angelschnur). Danach wird die Säule bis zum oberen Rand mit Aqua dest. gefüllt und die Umschnürung der Membran am Säulenauslauf kontrolliert. Liegt der Dialysierschlauch der Säulenwandung so dicht an, dass aus den Umschnürungsstellen kein Wasser austritt, so kann der Säulenboden von innen her durch einen Viskoseschwamm "abgedichtet" werden, der ein Auslaufen des Sephadexgeles mit der Elutionsflüssigkeit verhindert (Durchgängigkeit der Schwamm-poren prüfen). Der Schwammpfropf wird im oberen Teil der Säule unterhalb des Wasserspiegels mit einer Pinzette oder einem anderen geeigneten Instrument solange ausgedrückt, bis keine Luftblasen mehr entweichen, die—würden sie im Schwamm verbleiben—später in das Gelbett aufsteigen und es destruieren. Nach der Entlüftung wird der Schwammpfropf mit einem Glasstab auf den Boden der Säule geschoben, und anschliessend die Flüssigkeit aus der Säule bis etwa zur Hälfte abgelassen. Der Verschluss des Auslaufes erfolgt durch eine Schraubklemme. Nach diesen Vorbereitungen kann mit der Sedimentation des Gelbettes in der üblichen Weise begonnen werden. Während dieser Zeit sollte die Dialysiermembran in ein Gefäss mit Aqua dest. oder Puffer eintauchen.

Nach der Sedimentation des Gelbettes und dem Einstellen mit dem zu verwendenden Puffer wird das Probevolumen aufgetragen. Die Auftragung erfolgte mittels Applikator. Die Grösse der jeweiligen Probevolumina ist den Legenden der einzelnen Elutionskurven zu entnehmen. Mit der Montage des oberen Puffergefässes sollte gewartet werden, bis das Probevolumen etwa 2–3 cm tief in das Gelbett eingedrungen ist. Das Elutionsvolumen/h sollte möglichst niedrig gehalten werden, um die Elektoretardation während der Trennung voll auszunutzen. Die Kühlung des Gelbettes erfolgte durch auf +10 °C abgekühltes, den Säulenmantel durchströmendes Wasser.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Diffusionstest. Phosphatpuffer pH 7.4: 9.4 g Na_2HPO_4 ; 5.8 g KH_2PO_4 ad 800 ml Aqua dest.; Difco Noble Agar darin 1%ig lösen.

Immunoelktrophorese. Veronalpuffer pH 8.6: 3.9 g Diäthylbarbitursäure; 21.0 Na-diäthylbarbituricum; 3.0 g Calc. lact.; ad 2000 ml Aqua dest.; Difco Noble Agar darin 1.2%ig lösen. Elektroden: 2.7 g Diäthylbarbitursäure; 17.5 g Na-diäthylbarbituricum; 0.7 g Calc. lact.; Aqua dest. ad 2000 ml.

Retardationsfiltration. Tris-Zitronensäurepuffer pH 8.5: Für Anode und Filtration, 18.4 g Tris; 2.1 g Zitronensäure; Aqua dest. ad 2000 ml. Für Kathode, 10%ige KCl-Lösung.

* Das Prinzip des beschriebenen Säulenmodelles wurde zum Patentschutz angemeldet.

ERMITTLUNG DER BEWEGUNGSRICHTUNG DER PROTEINE

Sollen ungefärbte Proteinkomponenten durch Retardationsfiltration von einander getrennt werden, so ist eine visuelle Verfolgung der Wanderungsrichtung nicht möglich, eine Kontrolle jedoch unumgänglich. Als messbare Kontrollgrößen, durch deren Variation die Bewegungsrichtung gesteuert werden kann, existieren die Wattstärke des Gelbettes und das Effluentvolumen/h, das in der Sephadexliteratur als V_e/h bezeichnet wird. Wattstärke und V_e/h sind zwei von einander unabhängige Größen. Eine Erhöhung der Wattstärke beschleunigt die anodisch gerichtete Wanderung der meisten Serumproteine bei Verwendung alkalischen Puffers. Eine Vergrößerung des Effluentvolumens beschleunigt ihre Elution. Aus den Funktionsgrößen (Wattstärke und Effluentvolumen/h) lässt sich ein Quotient ermitteln,

$$\frac{\text{Effluentvolumen in ml/h}}{\text{Wattstärke des Gelbettes}} = \text{E/W Quotient}$$

der den Wert 0.15 in den ersten Stunden der Trennung nicht unterschreiten sollte. Bei einem E/W Quotienten von 0.15 wandert die Albuminfraktion noch gerade abwärts, sichtbar durch die an Albumin gekoppelten gefärbten Serumbestandteile. Hämoglobin wird unter den geschilderten Bedingungen schneller eluiert. Es kann daher bei geringerem E/W Quotienten getrennt werden. Da aber, wie aus der Elutionskurve (Fig. 4) ersichtlich ist, mehrere Serumproteine langsamer als Albumin eluiert werden, ist in den späteren Trennstunden der Quotient E/W zu vergrößern, da die Proteine sonst in den Anodenpuffer aufsteigen. Die Vergrößerung des Quotienten sollte nicht durch Erhöhung des Effluentvolumens, sondern durch Verminderung der Wattstärke erfolgen. Die Regulierung des Effluentvolumens erfolgte in den beschriebenen Versuchen durch eine Klemmschraube am Verbindungsschlauch zwischen Säulenauslauf und Kollektor. Es erwies sich als sehr zweckmässig, diese Klemmschraube nicht direkt an den meist dünnwandigen Kunststoffschlauch anzusetzen, da das Material nicht elastisch genug ist, und sich bei Erlöschen des Schlauchwandgedruckes das Effluentvolumen vermindert, sondern ein kurzes Stück Vakuumschlauch für das Anbringen der Schraubklemme zwischen zu schalten.

ERGEBNISSE

Aus den bisherigen Versuchen sollen zwei Elutionskurven den möglichen Anwendungsbereich der beschriebenen Methode andeuten.

Trennung von Rinderhämoglobin

Bei einer Trennung von Rinderhämoglobin durch Zonenelektrophorese auf Agar kann bei einigen Individuen der Zebu Rasse eine Teilung des Hämoglobins in die Komponenten A und B beobachtet werden. Beide Komponenten besitzen annähernd das gleiche Molekulargewicht, so dass eine präparative Trennung durch einfache Gelfiltration nicht möglich ist. Infolge ihrer unterschiedlichen Ladungsverhältnisse konnte durch Retardationsfiltration über Sephadex G-150 eine Trennung in zwei peaks erreicht werden (siehe Fig. 3).

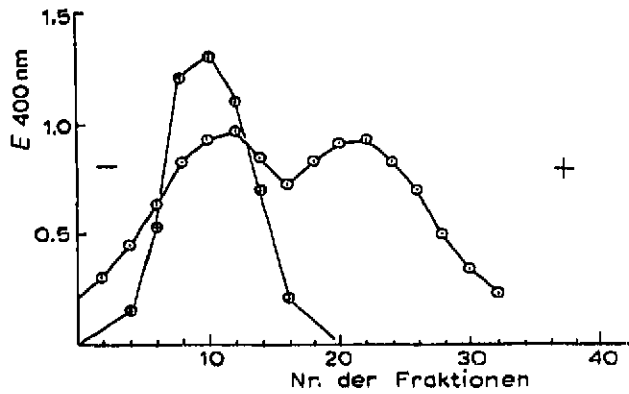


Fig. 3. ⊕—⊕, Elutionskurve einer Gelfiltration von 1 ml Rinder-Hb-Lösung (Zeburasse), Plexiglassäule nach Fig. 2, Sephadex G-150 (coarse); V_t , 294 ml; Betthöhe, 65 cm; Tris-Zitronensäurepuffer pH 8,5. ○—○, Elutionskurve einer Retardationsfiltration der gleichen Lösung in derselben Säule, Verwendung desselben Gelbettes und desselben Puffers, Trennzeit 42 h. Steuerungsdaten (Anfangswerte): 390 V, 45 mA, V_e/h 2-3 ml, E/W 0.157. Die breite Basis der peaks ist offenbar durch Diffusion während der Trennung entstanden.

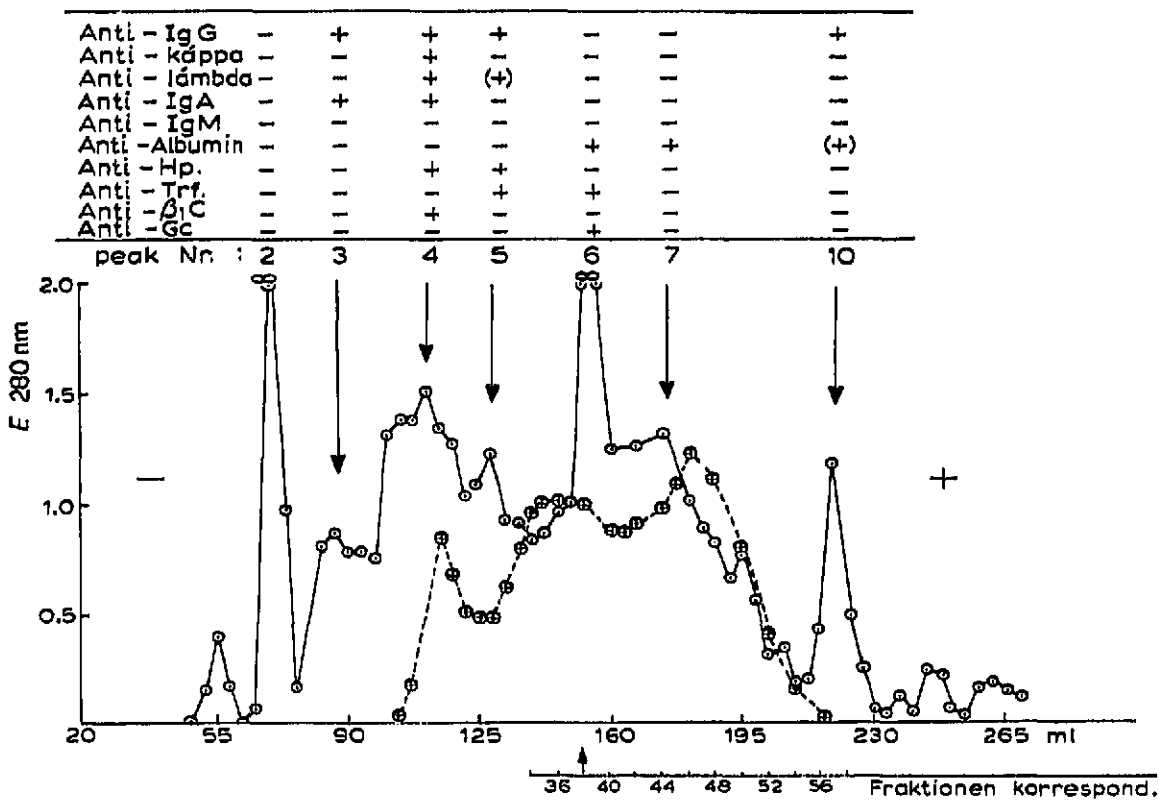


Fig. 4. ⊕ — — — ⊕ Elutionskurve einer Gelfiltration von 1.5 ml Humanserum, Sephadex G-200 (coarse), Plexiglassäule nach Fig. 2, Tris-Zitronensäure Puffer pH 8,5; V_t , 264 ml; Betthöhe, 58,5 cm; V_e/h = 64 ml. ○—○, Elutionskurve einer Retardationsfiltration von 3 ml Humanserumpool, Glassäule analog Fig. 2, Tris-Zitronensäure Puffer pH 7,8; Trennzeit, 50 h; Steuerungsdaten (Anfangswerte): 400 V, 75 mA, V_e/h = 5,6 ml; E/W, 0.18; Sephadex G-200 (coarse); V_t , 148 ml; Betthöhe, 67 cm. Die immunologischen Reaktionen der untersuchten Fraktionen sind oberhalb der Kurven, korrespondierend zu den getesteten peaks tabellarisch eingezeichnet.

Trennung von Humanserum

In der Kurve in Fig. 4 wird das Diagramm einer Auftrennung von 3 ml gepooltem Humanserum durch Retardationsfiltration gezeigt. Zum Vergleich wurde das Ergebnis einer einfachen Gelfiltration mit eingezeichnet. Durch die Retardationsfiltration werden die Serumproteine in 13 peaks aufgetrennt, von denen einige durch Verwenden monospezifischer Antiseren im Diffusionstest oder durch immunoelektrophoretische Analysen identifiziert werden konnten.

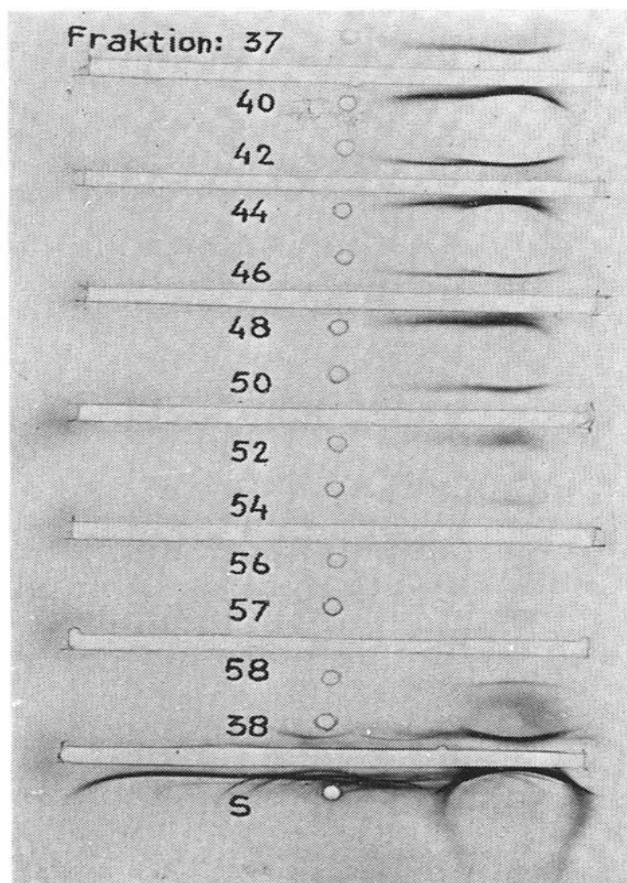


Fig. 5. Immunoelektrophoretische Analyse der Fraktionen 37–58 der Retardationsfiltration von Humanserum (Bezeichnung der Fraktionen vergleiche Fig. 4 unten). In der immunoelektrophoretischen Albuminposition (vergl. Ausgangsserum) stellen sich—in ihrer Konzentration von Fraktion 38 bis 54 abfallend—atypische Albuminpräzipitatfiguren dar, die sich aus zwei, möglicherweise drei Komponenten zusammensetzen.

Für die Untersuchung standen folgende Antiseren von Sevac, Prag zur Verfügung:

Anti-IgG, Anti-kappa, Anti-lambda, Anti-IgA, Anti-IgM, Anti-Hp, Anti-Trf, Anti- β_1 C, Anti-Gc.

Ferner wurde Anti-Albumin eigener Präparation verwendet. Die Diffusionsteste und Immunoelektrophoresen wurden in Agar Noble angesetzt. Die verwendeten Puffer sind verzeichnet unter *Zusammensetzung der verwendeten Puffer*. Die Antigenproben wurden nach der Säulenelution ohne weitere Einengung in die Startpositionen der Diffusionsteste und Immunoelektrophoresen verimpft.

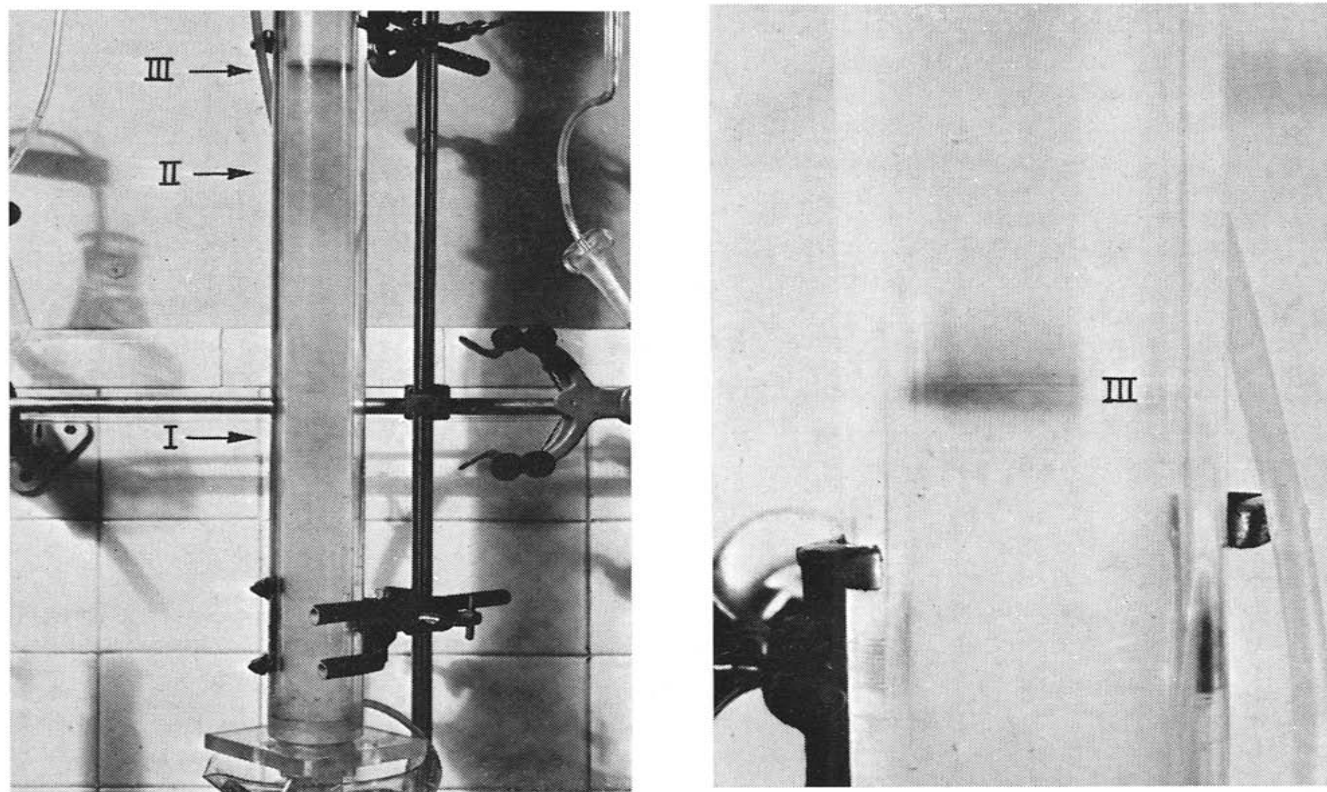


Fig. 6. Trennsituation in der Plexiglassäule nach 44 h Trennzeit. Probevolumen: 1 ml Humanserum. Sephadex G-200 Superfine, V_t , 294 ml; Steuerungsdaten (Anfangswerte): 150 V, 250 mA, V_e/h 11 ml, E/W von 0.29 im Trennverlauf abfallend auf 0.17. Der hohe mA Wert bei relativ niedriger Spannung wird durch 1% NaCl Zusatz zum verwendeten Elutionspuffer bedingt, Tris-Zitronensäurepuffer pH 8.5. Nach der Retardationsfiltration sind in der Säule zwei gelblich gefärbte Zonen vorhanden, in Fig. 6a als I und II bezeichnet sowie eine aus mehreren feinen Schichten bestehende III., intensiv gelblich gefärbte Fraktion, vgl. Fig. 6b. Die Fraktion III hatte sich in den letzten 11 h der Trennung bei 25 V, 40 mA, V_e/h 2.5 ml aus der Zone II getrennt und stieg in der Säule unter den beschriebenen Bedingungen aufwärts. Sie wurde, wie im Text erwähnt, aus der Säule nach oben heraus präpariert.

Unter den Analysen der Immunelektrophoresen sind die Reaktionsbilder albuminhaltigen Fraktionen auffällig (siehe Fig. 5).

Die Fraktionen 14 und 15 (peak 2) der Elutionskurve in Fig. 4 konnten durch immunologische Methoden bisher nicht identifiziert werden. Die Sulfosalizylsäureprobe ergab mit diesen beiden Fraktionen ein negatives Ergebnis. Beide Fraktionen zeigten bei einfacher Betrachtung eine deutliche Gelbfärbung. Das Absorptionsmaximum dieser Lösung liegt bei 279 nm (gemessen im Spectrophotometer Unicam Sp 700, fortlaufende Messung der Wellenlänge). Anstieg und Abfall des Kurvenverlaufes sind gegenüber einer Serummessung deutlich abgeflacht, so dass an eine Anreicherung eines Serumbestandteiles in diesen Fraktionen gedacht werden muss, für deren Identifizierung andere Methoden zu verwenden sind.

Bei der Retardationsfiltration von Humanserum über Sephadex G-200 Superfine wurde statt der oben erwähnten einen gelblich gefärbten Komponente eine Aufteilung in zwei deutlich von einander getrennte Zonen erreicht (siehe Fig. 6a), durch Pfeil bei I und II markiert. Darüber hatte sich eine dritte gefärbte Zone (Pfeil bei III) aus mehreren feinen Schichten bestehend gebildet (siehe Fig. 6b). Nach Ab-

schluss des Experimentes wurde diese mit III in der Fig. 6a bezeichnete Zone aus der Säule nach oben in der Weise herauspräpariert, indem das gesamte Gelbett durch Anschliessen eines Pufferreservoirs an den Säulenauslauf soweit angehoben wurde, dass die zu präparierende Gelzone aus dem oberen Säulenende herausragte. Es wurde eine intensiv gelblich gefärbte breiige Masse gewonnen, die sich nach Zugabe von 1 ml Elutionspuffer vollständig auflöste und dem Puffer eine bläuliche Farbe verlieh. Die mitherauspräparierten Sephadexpartikel setzten sich am Boden ab. Eine immunologische Reaktion dieser Fraktion mit Anti-Cöruoplasmin gelang nicht. Infolge der langen Trennzeit (44 h) ist an eine Denaturierung zu denken.

Die übrigen peaks mit einer Extinktion > 0.5 der Elutionskurve (Fig. 4) liessen sich mit einfachen Methoden weitgehend identifizieren. Die Resultate der Diffusionsteste wurden im oberen Teil der Fig. 4 tabellarisch, korrespondierend zu den untersuchten peaks, dargestellt.

DISKUSSION

Wie aus der Gegenüberstellung der Filtrationskurven in Fig. 4 (unterbrochene Linie = herkömmliche Gelfiltration; durchgezogene Linie = Retardationsfiltration) hervorgeht, wird ein Proteingemisch durch die Retardationsfiltration nicht nur in wesentlich mehr peaks getrennt, sondern es kann bei geringerem V_t (148 ml bei der Retardationsfiltration gegenüber 264 ml bei der Gelfiltration) ein doppelt so grosses Probevolumen aufgetragen werden. Durch Verfeinerung der Technik dürften die Trennergebnisse noch zu verbessern sein. Jedoch muss hervorgehoben werden, dass sowohl die von NERENBERG UND POGOJEFF²⁷ als auch die hier beschriebene Methode weniger zur Fraktionierung von Vollserum geeignet zu sein scheint, sondern sie wird möglicherweise eine grössere Bedeutung bei der Nachreinigung angereicherter Präparate oder Trennungen von Proteingemischen erlangen, die sich lediglich durch unterschiedliches elektrisches Potential bei annähernd gleichem Molekulargewicht unterscheiden (zum Beispiel: Hämoglobinkomponenten).

Eine umfassende Interpretation der Resultate einer Serumentrennung durch die hier beschriebene Methode ist aus den vorliegenden Befunden noch nicht ableitbar. So muss offen bleiben, auf Grund welcher Faktoren das Albumin in mindestens zwei, möglicherweise drei Komponenten getrennt wurde. Ob Polymerisationserscheinungen oder Spaltprodukte das vorliegende immunoelektrophoretische Bild verursachen (siehe Fig. 5), bedarf weiterer Untersuchungen. Dass die Albuminkomponente des menschlichen Serums inhomogen ist, geht aus zahlreichen Veröffentlichungen hervor. Die Doppelung des Bogens ist nicht durch das Vorliegen einer Bisalbuminämie bedingt, denn das Ausgangsserum zeigt diesen Befund nicht. Auch genetische Varianten, wie sie von MELARTIN²⁸ zusammenfassend beschrieben werden, liefern für den hier vorliegenden Befund keine Erklärung. Ein denaturierender Einfluss der prolongiert einwirkenden Spannung in Verbindung mit anderen Faktoren (Wärmeentwicklung im Innern des Gelbettes) ist vorerst nicht auszuschliessen.

In weiteren Versuchen wird zu klären sein, warum die IgM Fraktion sowie das Alpha₂-Makroglobulin auch durch gezielte immunologische Untersuchungen nicht nachweisbar waren.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode beschrieben, mit der die Proteine des Humanserums in einem Arbeitsgang in dreizehn verschiedene Fraktionen präparativ getrennt werden können. Rinderhämoglobin wurde mit dieser Technik in zwei Fraktionen getrennt. Das Verfahren bedient sich einer besonders für diese Zwecke konstruierten Säule, die mit grobmaschigem Sephadexgel gefüllt wird. Das Funktionsprinzip der Kolonne wird im einzelnen beschrieben. Die zusätzlichen Fraktionen entstehen durch Anlegen von Gleichspannung an die Säulenenden. Da die normale Filtrationsgeschwindigkeit der Proteinmoleküle grösser ist als ihre elektrophoretische Mobilität, wurde die Elektrode am oberen Säulenende als Anode geschaltet, sodass bei alkalischem pH die Trennkräfte entgegen gerichtet wirken. Dadurch werden die meisten Proteinmoleküle infolge ihrer unterschiedlichen negativen Ladung verschieden stark im Filtrationsprozess zurückgehalten. Als Bezeichnung für dieses Trennverfahren wird "Elektroretardations-Filtration" vorgeschlagen. Um eine optimale Trennung des Proteingemisches zu erreichen, muss bei niedrigem V_e/h gearbeitet werden, wodurch möglicherweise ein Aufsteigen einzelner Fraktionen in den Anodenpuffer hervorgerufen werden kann. Zur Kontrolle der Bewegungsrichtung wurde daher aus dem V_e/h in ml und der Wattstärke des Gelbettes ein Quotient (E/W-Quotient) gebildet, der nach empirischer Ermittlung bei einem Wert > 0.15 eine Elution der meisten Serumproteine gewährleistet.

Durch Verwenden monospezifischer Antisera wurden einzelne Fraktionen identifiziert. Albumin ergab in der Immunoelktrophorese ein atypisches Bild, bestehend aus zwei, möglicherweise drei Komponenten. IgG konnte in zwei voneinander weit getrennten peaks nachgewiesen werden.

LITERATUR

- 1 K. DOSE UND G. KRAUSE, *Naturwiss.*, 49 (1962) 349.
- 2 R. VENDRELY, Y. COIRAULT UND A. VANDERPLANCKE, *C.R. Acad. Sci.*, 258 (1964) 6399.
- 3 L. Å. HANSON, B. G. JOHANSSON UND L. RYMO, *Clin. Chim. Acta*, 14 (1966) 391.
- 4 L. Å. HANSON, P. ROOS UND L. RYMO, *Nature*, 212 (1966) 948.
- 5 C. VERGANI, R. STABILINI UND A. AGOSTONI, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 135.
- 6 B. GELOTTE, P. FLODIN UND J. KILLANDER, *Arch. Biochem. Biophys.*, Suppl. 1 (1962) 319.
- 7 F. G. LOONTIENS UND C. K. DE BRUYNE, *Naturwiss.*, 50 (1963) 614.
- 8 J. PORATH, in C. A. WILLIAMS UND M. W. CHASE (Editors), *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Vol. II, Academic Press, New York and London, 1968, p. 67.
- 9 P. FLODIN UND J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 175.
- 10 P. N. CAMPBELL UND N. E. STONE, *Biochem. J.*, 62 (1956) 9.
- 11 H. DELLWEG, E. BECHER UND K. BERNHAUER, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 88.
- 12 W. N. CHRISTENSON, J. DACIE UND B. CROUCHER, *Brit. J. Haematol.*, 3 (1957) 262.
- 13 A. H. F. LAURELL, *Studies on preparative vertical zone electrophoresis*, Almquist & Wiksells Boktryckeri AB, Uppsala, 1958.
- 14 CH. WUNDERLY, *La electroforesis en papel*, Editorial Científico Médica, Barcelona, 1960.
- 15 H. E. SCHULTZE UND J. F. HEREMANS, *Molecular Biology of Human Proteins*, Vol. I, Elsevier, Amsterdam, 1966.
- 16 S. RAYMOND UND L. WEINTRAUB, *Science*, 130 (1959) 711.
- 17 R. A. REISFELD, U. J. LEWIS UND D. E. WILLIAMS, *Nature*, 195 (1962) 281.
- 18 U. J. LEWIS UND M. O. CLARK, *Anal. Biochem.*, 6 (1963) 303.
- 19 J. V. MAIZEL, JR., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6 (1963) 483.
- 20 J. V. MAIZEL, JR., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol. 121, Art. 2 (1964) 382.
- 21 T. JOVIN, A. CHRAMBACH UND M. A. NAUGHTON, *Anal. Biochem.*, 9 (1964) 351.
- 22 K. SIMONS UND A. G. BEARN, *Biochim. Biophys. Acta*, 133 (1967) 499.
- 23 P. H. DUESBERG UND R. R. RUECKERT, *Anal. Biochem.*, 11 (1965) 342.

- 24 S. HJERTÉN, S. JERSTEDT UND A. TISELIUS, *Anal. Biochem.*, 11 (1965) 211.
- 25 S. HJERTÉN, S. JERSTEDT UND A. TISELIUS, *Anal. Biochem.*, 11 (1965) 219.
- 26 A. H. GORDON UND L. N. LOUIS, *Anal. Biochem.*, 21 (1967) 190.
- 27 S. T. NERENBERG UND G. POGOJEFF, *Amer. J. Clin. Pathol.*, 51 (1969) 728.
- 28 L. MELARTIN, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Suppl. 191 (1967).

J. Chromatogr., 56 (1971) 241-252