

CHROM. 10,973

KONTINUIERLICHE TRÄGERFREIE ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG

H. WAGNER und W. SPEER

Fachrichtung Anorganische Analytik und Radiochemie der Universität des Saarlandes, 6600 Saarbrücken (B.R.D.)

(Eingegangen am 17. Januar 1978; geänderte Fassung eingegangen am 24. Februar 1978)

SUMMARY

Continuous free-flow isoelectric focusing

Investigations of continuous isoelectric focusing are carried out in a modified apparatus for free-flow electrophoresis. This procedure enables amphoteric biochemical substances to be separated without damage. The optimum conditions for separation are derived from the influences of various parameters on the separation result. Individual proteins and their mixtures are used as test substances.

EINLEITUNG

Die isoelektrische Fokussierung gestattet bei hoher Auflösung die schnelle Trennung amphoterer biochemischer Substanzen wie Peptide, Proteine, Enzyme und Hormone¹⁻⁴. Im analytischen, aber auch im präparativen Bereich werden die Trennungen meist in Polyacrylamidgel oder in granulierten Gelen durchgeführt. Bei präparativen Fokussierungen in Säulenapparaturen erfolgt die Stabilisierung des pH-Gradienten durch Dichtegradienten.

Über kontinuierliche Verfahren zur isoelektrischen Fokussierung ist wenig bekannt. So dienen Versuche in Eigenbauapparaturen dazu, die Technik der trägerfreien Durchflusselektrophorese auch für eine Fokussierung auszunutzen⁵⁻⁷. Um Störungen durch Thermokonvektion bei geringen Durchflussgeschwindigkeiten zu umgehen, wird von anderen Autoren eine Stabilisierung entweder durch Sephadex-Gel⁸ oder durch Dichtegradienten⁹ vorgeschlagen. Diese Verfahren haben den Nachteil sehr langer Verweilzeiten.

In einer analytischen Trennapparatur zur trägerfreien Durchflusselektrophorese werden Verweilzeiten von 30 min durch mehrmalige Eingabe der Fraktionen (recycling)¹⁰ erhalten. Der Vorteil der kontinuierlichen Arbeitstechnik geht dabei jedoch verloren.

Ausgehend von Erfahrungen mit der schnellen Gleichgewichtseinstellung bei der trägerfreien kontinuierlichen Trennung und Anreicherung von Metallionen wird die hierbei verwendete und bereits beschriebene Trennapparatur¹¹ für die isoelektrische Fokussierung umgerüstet. Die Ergebnisse der grundlegenden Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Parameter wie Verweilzeit und Feldstärke auf die

Ausbildung und Stabilität des pH-Gradienten liefern die optimalen Trennbedingungen. Trennkapazität, Trennschärfe sowie Reproduzierbarkeit werden anhand einiger Proteintrennungen untersucht.

EXPERIMENTELLES

Chemikalien, Geräte und Versuchsanordnung

Die Trägerampholyte "Servalyt" und die Testproteine sind bezogen von Serva (Heidelberg, B.R.D.). Bei den Chemikalien für die Elektrodenpuffer handelt es sich um p.a.-Substanzen von Merck (Darmstadt, B.R.D.).

Die Elektrophoreseapparatur setzt sich zusammen aus der Eigenbaukammer, dem hochstabilisierten Netzgerät von Knott Elektronik (München, B.R.D.) und der Kühlbox 2000 von Serva. Die Zufuhr des Probengemisches erfolgt über eine Schlauchpumpe Varioperpex von LKB (Bromma, Schweden). Zur Extinktionsmessung dient das Durchflussphotometer PM 2 D von Zeiss (Oberkochen, B.R.D.). Die pH- und Leitfähigkeitsmessungen erfolgen mit dem WTW Digitalmeter DIGI 610 (Weilheim, B.R.D.).

Fig. 1 zeigt die schematische Darstellung der Versuchsanordnung.

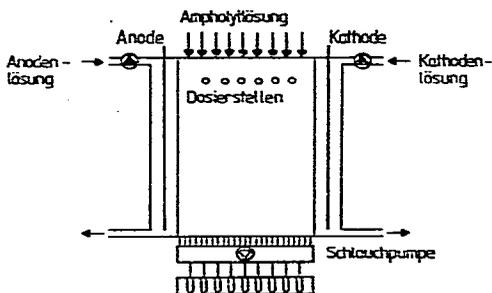


Fig. 1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur trägerfreien isoelektrischen Fokussierung.

Die eigentliche Trennkammer besteht aus einem zweiteiligen Plexiglasblock mit Trennspace, Kühlkammern, Elektrodenräumen und Zu- bzw. Abflussbohrungen. Der Trennspace wird durch zwei Glasplatten gebildet, die durch dünne PVC-Streifen auf einem Abstand von 0,4 mm gehalten werden. Die Zufuhr der Trägerampholyt-Lösung erfolgt über neun PVC-Schläuche. Die Analysenlösung wird mittels einer regelbaren Schlauchpumpe durch spezielle Bohrungen (Dosierstellen) in den Trennspace zugeführt. Am Ende der Trennstrecke entnimmt man die Flüssigkeit durch 87 Spaghettischläuche. Eine Schlauchpumpe mit elektronischem Regelteil sorgt für den kontinuierlichen Durchfluss der Lösung. An den Längsseiten befinden sich die beiden Elektrodenräume. Trennspace und Elektrodenräume stehen über Ionenaustauschermembranen im elektrischen Kontakt. Als Elektrodenlösung dienen auf der Anodenseite 0,4 M H_3PO_4 und auf der Kathodenseite 0,6 M NaOH. Die Elektrodenlösungen werden kontinuierlich durch Zupumpen erneuert.

Die gesamte Versuchsanordnung befindet sich in einer Kühlbox, die das Arbeiten im Temperaturbereich von -10 bis $+10^\circ$ gestattet. Hierdurch werden Träger-

ampholyt- und Analysenlösung, vorgekühlt und die Fraktionen auf der Trenntemperatur gehalten.

Die Bestimmung der getrennten Substanzen erfolgt durch Messung der Extinktion bei 280 nm im Durchflussphotometer und Ermittlung des pI -Wertes. Zusätzlich werden noch pH und Leitfähigkeit der einzelnen Fraktionen gemessen.

ERGEBNISSE

Ausbildung des pH-Gradienten

Die vollständige Ausbildung des pH-Gradienten muss gewährleistet sein. Sie hängt von der Feldstärke und der Verweilzeit ab. Bei der vorgegebenen Versuchsanordnung kann die Feldstärke zwischen 0 und 180 V/cm variiert werden. Die Durchflussgeschwindigkeit ist von 0 bis 800 cm³/h kontinuierlich regelbar. Hieraus lassen sich bei bekanntem Trennsplattvolumen die entsprechenden Verweilzeiten berechnen.

Für jede angelegte Feldstärke muss die für die Ausbildung des pH-Gradienten notwendige Verweilzeit ermittelt werden. Die optimale Feldstärke beträgt bei der gewählten Versuchsanordnung 110 V/cm. Fig. 2 zeigt die Ausbildung des pH-Gradienten bei schrittweiser Änderung der Verweilzeit und damit der Durchflussgeschwindigkeit. Das Leitfähigkeitsprofil zeigt, dass bei einer Verweilzeit von 20 min die vollständige Ausbildung des pH-Gradienten erfolgt ist. Eine weitere Erhöhung der Verweilzeit führt zu keiner Verbesserung des pH-Gradienten.

Verwendet wird 1%ige Trägerampholytlösung. Versuche mit geringeren Konzentrationen ergeben deutliche Verschlechterungen in der Trennkapazität. Fokussierungen mit höheren Trägerampholytkonzentrationen erfordern höhere Feldstärken bzw. geringere Durchflussgeschwindigkeiten und führen aufgrund der höheren Leitfähigkeit zu einer Zunahme der Jouleschen Wärme und damit zu Kühlproblemen.

Fokussierungen von Einzelproteinen und Proteingemischen

Untersucht werden die Trennkapazität, das Auflösungsvermögen und der Einfluss der Zugabestelle.

Mit Trennkapazität wird die maximal fokussierbare Proteinmenge bezeichnet. Sie ist von der eingesetzten Substanz abhängig. Der Durchschnittswert beträgt bei 1%iger Trägerampholytlösung 1 mg/h für das Einzelprotein. Bei grösseren Durchsätzen treten Abweichungen von der ursprünglichen Form des pH-Gradienten auf. Für einwandfreie Trennungen nahe beieinander gelegener Zonen ist die Trennkapazität oft geringer, wie das Beispiel der Fokussierung von Pferdedemyoglobin (Fig.3) zeigt.

Allgemein hängt das Auflösungsvermögen der isoelektrischen Fokussierung von der Feldstärke, aber auch von der Steilheit des pH-Gradienten ab und entspricht der pI -Wertdifferenz zweier noch getrennter Substanzen¹²:

$$pI = 3 \sqrt{\frac{D \frac{dpH}{dx}}{-E \frac{dn}{dpH}}}$$

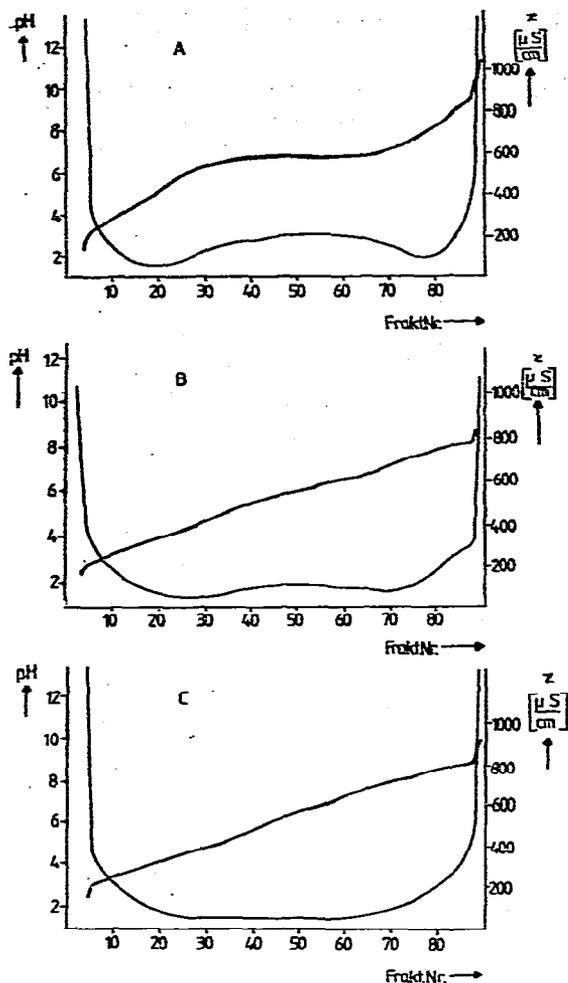


Fig. 2. Abhängigkeit des pH-Gradienten und des Leitfähigkeitsprofils von der Verweilzeit bzw. Durchflussgeschwindigkeit der Trägerampholytlösung bei einer Feldstärke von 110 V/cm. Untere Kurve: Verlauf der Leitfähigkeit, obere Kurve: Verlauf des pH-Wertes. A, Durchflussgeschwindigkeit: 120 cm³/h, Verweilzeit: 10 min; B, Durchflussgeschwindigkeit: 70 cm³/h, Verweilzeit: 17 min; C, Durchflussgeschwindigkeit: 50 cm³/h, Verweilzeit: 20 min.

wo D = Diffusionskoeffizient des Proteins, dpH/dx = Anstieg des pH-Gradienten, E = Feldstärke, dn/dpH = Änderung der Beweglichkeit des Proteins mit dem pH-Wert und D und dn/dpH = Konstanten des Proteins.

Im flachen pH-Gradienten sind die Zonen im Vergleich zur Fokussierung im ausgedehnten pH-Bereich zwar breiter, die Trennungen als solche aber besser (Fig. 4). Das Bandenverhältnis ist in beiden Fällen gleich.

Ein wesentlicher Einfluss der Zugabestelle auf die Fokussierung tritt bei den gewählten Trennbedingungen nicht auf. Auch bei Zugabe im Anoden- oder Kathodenbereich werden, wie das Beispiel der Fokussierung von Rinderserumalbumin (Fig.

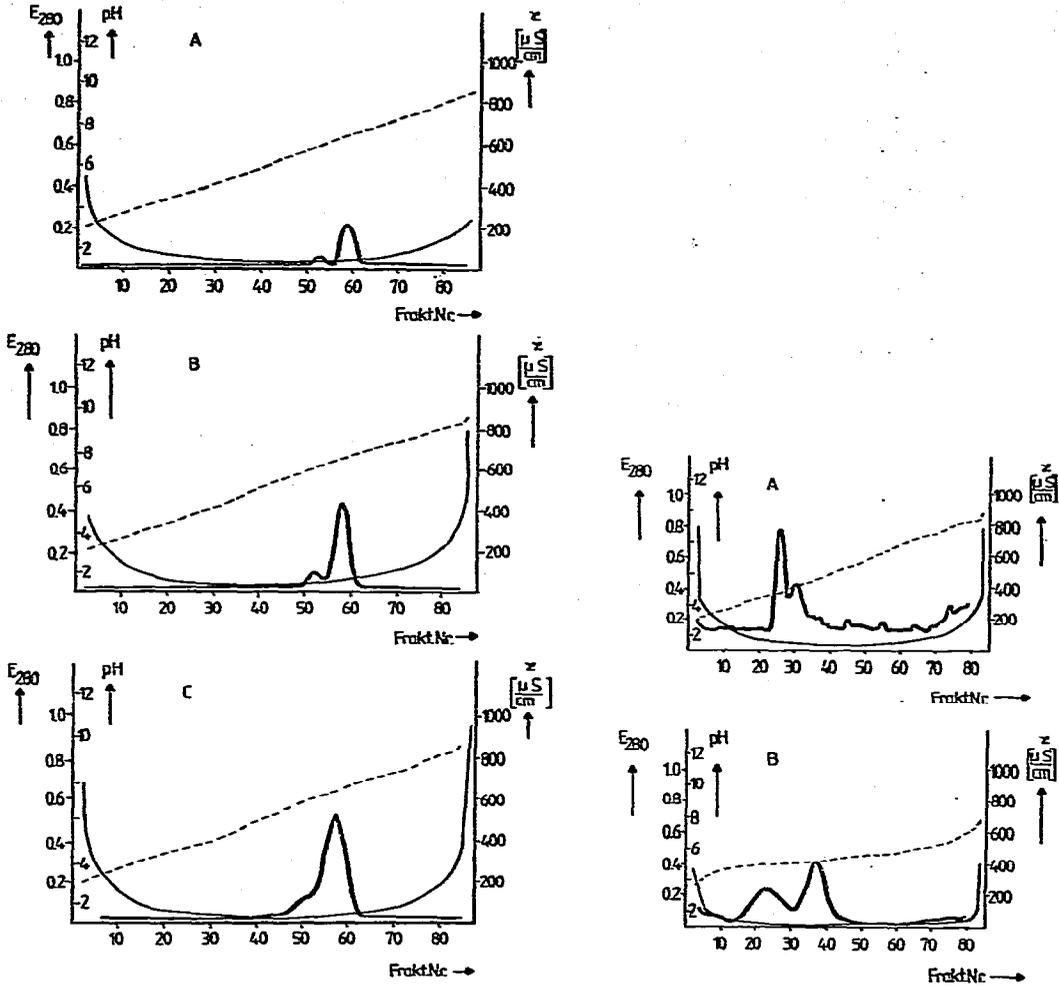


Fig. 3. Einfluss der Trennkapazität auf die Trennschärfe bei der Fokussierung von Pferdemyoglobin. Feldstärke: 110 V/cm, Verweilzeit: 25 min. A, 0.2 mg Protein/h; B, 0.4 mg Protein/h; C, 0.8 mg Protein/h.

Fig. 4. Einfluss der Steilheit des pH-Gradienten auf das Auflösungsvermögen bei der isoelektrischen Fokussierung. Trennung von Rinderserumalbumin und β -Lactoglobulin. Feldstärke: 110 V/cm, Verweilzeit: 25 min. A, pH-Gradient von 2-11; B, pH-Gradient von 4-6

5) zeigt, übereinstimmende Ergebnisse erhalten. Ist die Zugabestelle sehr weit vom Fokussierungsbereich des Proteins entfernt, sind die erhaltenen Zonen lediglich etwas breiter. Bei Mehrkomponentengemischen (Fig. 6), die mit hoher Auflösung getrennt werden sollen, reicht unter Umständen eine Trennoperation nicht aus. In diesen Fällen müssen entsprechende Fraktionen entweder im selben oder besser im eingengen pH-Bereich nochmals getrennt werden.

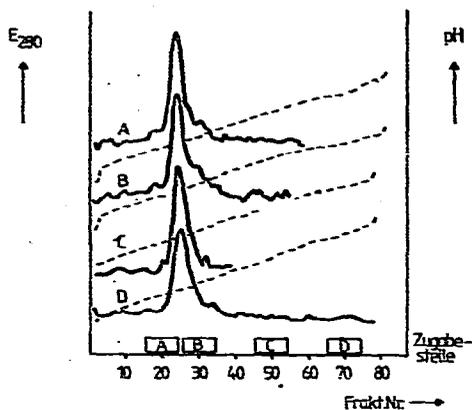


Fig. 5. Abhängigkeit der Fokussierung von der Zugabestelle beim Rinderserumalbumin. Feldstärke: 110 V/cm, Verweilzeit: 25 min.

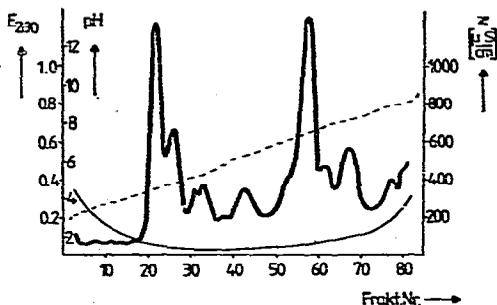


Fig. 6. Isoelektrische Fokussierung eines Proteintestgemisches. (Ferritin, Rinderserumalbumin, β -Lactoglobulin, Conalbumin, Pferdehymoglobin, Walmyoglobin, Ribonuclease, Cytochrom c). Feldstärke: 110 V/cm, Verweilzeit: 25 min.

ZUSAMMENFASSUNG

In einer umgerüsteten Apparatur zur trägerfreien Durchflusselektrophorese werden Untersuchungen zur kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung durchgeführt. Dieses Verfahren erlaubt die schonende präparative Trennung amphoterer biochemischer Substanzen. Aus den Einflüssen der verschiedenen Parameter auf das Trennergebnis ergeben sich die optimalen Trennbedingungen. Als Testsubstanzen dienen Einzelproteine und Proteingemische. Bei Verweilzeiten von 20–30 min werden reproduzierbare Trennergebnisse erhalten, damit wird die kontinuierliche trägerfreie isoelektrische Fokussierung für präparative Trennungen interessant.

DANK

Für finanzielle Unterstützung danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad Godesberg.

LITERATUR

- 1 N. Catsimpoolas, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 209 (1973).
- 2 J. P. Arbutnott, *Isoelectric Focusing*, Butterworths, London, 1974.
- 3 P. G. Righetti, *Progress in Isoelectric Focusing and Isotachopheresis*, Elsevier, Amsterdam, 1975.
- 4 N. Catsimpoolas, *Isoelectric Focusing*, Academic Press, New York, 1976.
- 5 N. Seiler, J. Thobe und G. Werner, *Z. Anal. Chem.*, 252 (1970) 179.
- 6 N. Seiler, J. Thobe und G. Werner, *Z. Physiol. Chem.*, 351 (1970) 865.
- 7 Z. Prusik, *J. Chromatogr.*, 91 (1974) 867.
- 8 G. Hedenskog, *J. Chromatogr.*, 107 (1975) 91.
- 9 J. S. Fawcett, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 209 (1973) 112.
- 10 K. Hannig, H. Wirth, R. K. Schindler und K. Spiegel, *Z. Physiol. Chem.*, 358 (1977) 753.
- 11 H. Wagner, D. Neupert und K. Schlick, *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 357.
- 12 H. Svensson, *Acta Chem. Scand.*, 15 (1961) 325.