

Journal of Chromatography, 497 (1989) 231-235

Biomedical Applications

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 5021

Note

Das Erythrocruorin des Regenwurms (*Lumbricus terrestris*) als Eichsubstanz in der Gelchromatographie

WOLFGANG K.R. BARNIKOL*, OSWALD BURKHARD und HARALD PÖTZSCHKE

*Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität,
Saarstrasse 21, D-6500 Mainz (B.R.D.)*

(Eingegangen am 16. Augustus 1989)

Die Bestimmung der Molekulargewichte von Makromolekülen mittels Gelchromatographie ist wegen ihrer Einfachheit eine weit verbreitete Methode [1,2]. Andere Methoden, wie die Ultrazentrifugation, sind aufwendiger und vermögen auch nur weniger eindeutige Ergebnisse zu liefern. Eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung dieses Verfahrens jedoch sind Eichsubstanzen, deren Form und Dichte den zu analysierenden Molekülen möglichst ähnlich sind. Für den herkömmlichen Molekulargewichtsbereich sind Eichproteine kommerziell erhältlich. Anders liegen die Verhältnisse für den Fall hochmolekularer Proteine, das heisst Proteinen mit einem Molekulargewicht grösser als 10^6 g/mol. Hier besteht ein Bedarf an geeigneten Eichsubstanzen. Diese sollten möglichst einheitlich sein, eine definierte Molekülgrösse besitzen und auch möglichst einfach zu erhalten sein.

Wir beschäftigen uns seit einiger Zeit mit der Synthese hyperpolymerer Hämoglobine, um eine künstliche, den Sauerstoff-Transport des Menschen unterstützende Lösung zu entwickeln, deren kolloidosmotischer Druck möglichst klein sein soll. Durch eine Vernetzung des Hämoglobins mit bifunktionellen Reagenzien in hochkonzentrierter Lösung (35 g/dl) ist es gelungen, lösliche hyperpolymere Hämoglobine zu erhalten [3-6]. Es galt nun nachzuweisen, dass im Reaktionsgemisch tatsächlich genügend grosse Moleküle vorliegen, und es galt deren Molekulargewicht sowie die Verteilung zu bestimmen. Um den Nachweis mittels Gelchromatographie sicher führen zu können, müs-

sen jedoch geeignete Eichsubstanzen zur Verfügung stehen, und darum wurde das Erythrocruorin des Regenwurms (*Lumbricus terrestris*) als Eichsubstanz eingesetzt. Der Vorteil dieser Substanz ist, dass sie ein definiertes, wohl bekanntes Molekulargewicht besitzt, völlig einheitlich ist und dass Regenwürmer relativ einfach zu erhalten sind. Weiterhin absorbiert das Erythrocruorin des Regenwurms im sichtbaren Bereich, so dass sich die Detektion des Moleküls optisch sehr einfach gestaltet.

EXPERIMENTELLES

Zur Gewinnung des Regenwurm-Erythrocruorins schneidet man einen Regenwurm hinter dem siebenten Segment durch und nimmt die vom Körperstück austretende Erythrocruorin-Lösung mit einer Kapillare auf. Hierbei gewinnt man in der Regel 30–50 μl , einer Lösung, deren Konzentration an Erythrocruorin etwa 6 g/dl beträgt (bestimmt mit der Cyan-Hämoglobin-Methode). Diese Lösung kann nach Verdünnung auf etwa 0,5 g/dl auf eine Gelchromatographie-Säule (80 cm \times 1 cm I.D.) gegeben werden. Die Säule war mit Sephacryl S400 HR (Deutsche Pharmacia, Freiburg, B.R.D.) gefüllt, das für die Analyse hoher Molekulargewichtsbereiche besonders geeignet ist. Das Elutionsmittel war eine wässrige Lösung der folgenden Zusammensetzung: NaCl, 125 mmol/l; KCl 4,5 mmol/l; NaHCO₃, 20 mmol/l. Zur Entkeimung enthielt das Elutionsmittel 0,02 g/dl Natriumazid, der pH-Wert war 8,6. Als Detektor diente ein Photometer mit einer Durchflussküvette (Schichtdicke 1 cm); es wurde die Absorption der Wellenlänge 425 nm gemessen. Der Fluss war 5,3 ml/h, die Temperatur betrug 22 °C. Das Ausschlussvolumen der Säule (V_0) wurde mit Hilfe von Dextran-Blau (Deutsche Pharmacia) bestimmt, das gesamte Volumen (V_t) mit Glutathion (Merck, Darmstadt, B.R.D.). Neben

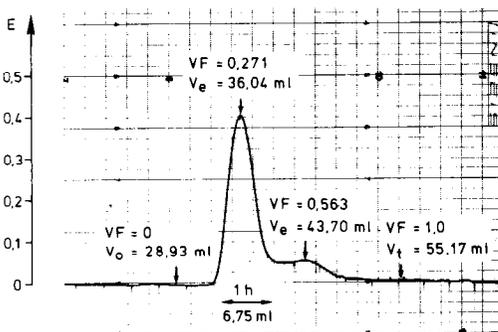


Fig. 1. Chromatogramm des Regenwurm-Erythrocruorins. Für Bedingungen, siehe Text. $VF = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, wobei V_0 = Ausschlussvolumen, V_t = Gesamtvolumen und V_e = Elutionsvolumen, Probenvolumen, 70 μl ; Konzentration, 0,5 g/dl. E = Extinktion.

Erythrocrucorin wurden noch Thyroglobulin, Rinder-Albumin und Ribonuklease A (alle von Deutsche Pharmacia) als weitere Eichsubstanzen auf die Säule gegeben; sie lassen sich bei der Wellenlänge 275 nm detektieren. In Fig. 1 ist ein Original-Chromatogramm des Regenwurm-Erythrocrucorins gezeigt.

Das Hauptmaximum für Erythrocrucorin ist klar erkennbar, ferner findet sich stets ein Nebenmaximum in Bereich kleinerer Molekulargewichte. Für die Eichung fand nur das Hauptmaximum Verwendung.

ERGEBNISSE

Es ist aus der Methodik der Gelchromatographie allgemein bekannt dass der Volumenfaktor (VF) mit dem Logarithmus des Molekulargewichts linear abnimmt. Es ist $VF = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, wobei $V_e =$ Elutionsvolumen.

Gemäss der beschriebenen Bedingungen wurde nun dementsprechend die Eichkurve des Molekulargewichts erstellt, wobei den drei verwendeten käuflichen Eichsubstanzen folgende Molekulargewichte zukommen: Ribonuklease A, 13 700 g/mol; Rinderalbumin, 67 000 g/mol; Thyroglobulin, 669 000 g/mol.

Das Molekulargewicht des Regenwurm-Erythrocrucorins ist von verschiedenen Untersuchern mit Lichtstreuung und der Ultrazentrifuge bestimmt worden (zusammenfassende Darstellung siehe Lit. 7). Folgende Werte sind genannt (in 10^6 g/mol): 3,14 und 2,95 [8]; 3,10 [9]; 3,45 [10]; 3,86 [11]. In einer neueren Arbeit [12] finden sich folgende weitere Werte (in 10^6 g/mol): 2,73 [13]; 2,5 [14]; 3,23 [15]; 2,92 [16]; 3,68 [17]; 3,95 [18]; 4,1 [19]; 3,8 [12]. Bildet man aus allen genannten Werten den Mittelwert, so erhält man $3,34 \cdot 10^6 \pm 0,51 \cdot 10^6$ g/mol. Dieser Wert ist in Fig. 2 eingetragen, ihn schlagen

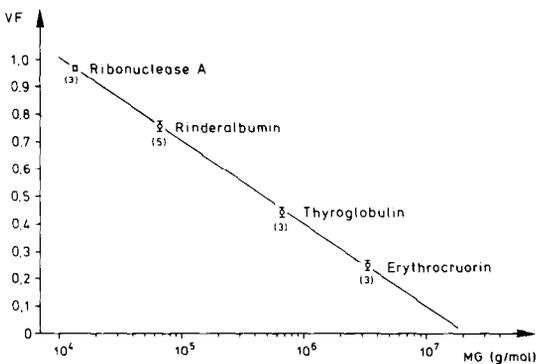


Fig. 2. Molekulargewichts-Eichkurve der mit Sephacryl 400 HR gefüllten Säule. Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Messpunkte an.

wir als Eichwert vor. Fig. 2 zeigt die Eichkurve des Molekulargewichts. Die gemessenen Mittelwerte der Volumenfaktoren nebst Stichprobenabweichungen sind in das Diagramm gezeichnet. Innerhalb des Messfehlers (Stichprobenabweichung) weist das Diagramm einen linearen Zusammenhang auf. Hiermit ist die Brauchbarkeit des Regenwurm-Erythrocruorins als Eichsubstanz der Gelchromatographie für Proteine aufgezeigt. Die chromatographische Reproduzierbarkeit ist mit derjenigen anderer Eichsubstanzen vergleichbar.

DISKUSSION

Das Molekulargewicht des Regenwurm-Erythrocruorins kann nicht nur als durch die oben genannten anderen Verfahren gegeben angesehen werden, es lässt sich vielmehr auch mit Hilfe der in Ergebnisse aufgeführten drei Eichproteine unter Annahme einer linearen Molekulargewichtseichkurve und mit Hilfe der gemessenen Volumenfaktoren des Erythrocruorins und seiner Stichprobenabweichung bestimmen. Der Wert beträgt $2,9 \cdot 10^6$ g/mol und der Streubereich ist $2,4 \cdot 10^6$ – $3,4 \cdot 10^6$ g/mol. Wiechelman und Parkhurst [14] haben mit Hilfe der Gelchromatographie einen Wert von $2,5 \cdot 10^6$ g/mol gemessen (siehe auch oben). Beide mit der Gelchromatographie bestimmten Werte sind kleiner als der oben angegebene Mittelwert von allen Methoden ($3,34 \cdot 10^6$ g/mol). Die Ursache ist vermutlich darin zu sehen, dass das gelchromatographische Verfahren im Prinzip nach der Molekülgröße trennt und dass das partielle Volumen des Regenwurm-Erythrocruorins besonders klein ist, dass es sich also um ein dicht gepacktes Molekül handelt.

Von Interesse ist auch das Molekulargewicht des Nebenmaximums. Wie Fig. 1 zeigt, beträgt sein Volumenfaktor 0,563 und mit Hilfe der Eichkurve in Fig. 2 ermittelt man ein Molekulargewicht von 275 000 g/mol. Das Verhältnis zum Molekulargewicht des Hauptmaximums ergibt sich zu $3,34 \cdot 10^6 / 275\,000 = 12,15$, das heisst, es hat innerhalb der Streubreite den Wert 12.

Die Zahl weist darauf hin, dass das Erythrocruorin des Regenwurms in dem verwendeten Elutionsmilieu zu einem kleinen Teil in zwölf Untereinheiten zerfällt. Das Ergebnis bestätigt die früheren Molekulargewichtsbestimmungen mit Hilfe der Ultrazentrifuge von Chiancone et al. [20]. Die Autoren zeigen einen zunehmenden Zerfall des Moleküls in zwölf Untereinheiten mit steigendem pH-Wert auf, welcher bei pH 8,0 beginnt.

Das Vorhandensein des Neben-Maximums mit dem definierten Molekulargewicht 275 000 g/mol bietet für die Gelchromatographie den Vorteil, mit dem Regenwurm-Erythrocruorin neben dem Molekulargewicht $3,34 \cdot 10^6$ g/mol gleichzeitig eine weitere Eichmarke im unteren Molekulargewichtsbereich für Proteine zu haben.

Vorteil des Regenwurm-Erythrocruorins ist seine leichte Zugänglichkeit: Regenwürmer lassen sich im Garten fangen oder im Anglergeschäft kaufen.

Die Verwendung des Regenwurm-Hämoglobins schliesst eine Lücke für Eichsubstanzen der Gelchromatographie.

LITERATUR

- 1 P. Andrews, in D. Glick (Herausgeber), *Methods of Biochemical Analysis*, Band 18, Interscience Publishers, New York, London, 1970, S. 1-53.
- 2 T.G. Cooper, *Biochemische Arbeitsmethoden*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1981.
- 3 W.K.R. Barnikol und O. Burkhard, *J. Biomater. Artif. Cells Artif. Organs*, 16 (1988) 639-642.
- 4 W.K.R. Barnikol und O. Burkhard, *Adv. Biol. Med. Phys.*, 248 (1989) 335-340.
- 5 W.K.R. Barnikol und O. Burkhard, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 215 (1987) 129-134.
- 6 W.K.R. Barnikol und H. Pötzschke, *Biol. Chem. Hoppe Syeler*, 369 (1988) 793-794.
- 7 M. Ching Ming Chung und H.D. Ellerton, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 35 (1979) 53-102.
- 8 T. Svedberg und K.O. Pedersen, *The Ultracentrifuge*, Clarendon Press, Oxford, 1940, S. 358-362.
- 9 J.M. Harrington, E.R. Pantolfelli und T.T. Herskovits, *Biochim. Biophys. Acta*, 328 (1973) 61-73.
- 10 M.R. Rossi Fanelli, E. Chiancone, P. Vecchini und E. Antonini, *Arch. Biochem. Biophys.*, 141 (1970) 278-283.
- 11 E.J. Wood, L.J. Mosby und M.S. Robinson, *Biochem. J.*, 153 (1976) 589-596.
- 12 S.N. Vinogradov und P. Kolodziej, *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B (1988) 577-579.
- 13 T. Svedberg und I.B. Eriksson, *J. Am. Chem. Soc.*, 55 (1933) 2834-2841.
- 14 K.J. Wiechelmann und L.J. Parkhurst, *Biochemistry*, 11 (1972) 4515-4520.
- 15 J.M. Shlom und S.N. Vinogradov, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 7904-7912.
- 16 J.P. Harrington und T.T. Herskovits, *Biochemistry*, 14 (1975) 4972-4976.
- 17 S.N. Vinogradov, J.M. Shlom, B.C. Hall, O.S. Kapp und H. Mizukami, *Biochem. Biophys. Acta*, 492 (1977) 136-155.
- 18 I. Pilz, E. Schwartz und S.N. Vinogradov, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2 (1980) 279-283.
- 19 S.N. Vinogradov, J.M. Shlom, O.H. Kapp und P. Frossard, *Comp. Biochem. Physiol.*, 67B (1980) 1-16.
- 20 E. Chiancone, P. Vecchini, M.R. Rossi Fanelli und E. Antonini, *J. Mol. Biol.*, 70 (1972) 73-84.