

Größenbestimmung biologischer Partikel durch Gelchromatographie an Sepharose 6B

Determination of Particle Size by Gel Chromatography with Sepharose 6B

WOLFRAM GERLICH

Abteilung für Virologie der Universität Frankfurt am Main (Leitung: Prof. Dr. G. MAY)

(Z. Naturforsch. 26 b, 1040—1044 [1971]; eingegangen am 21. Juli 1971)

Gel chromatography with 6% agarose gel (Sepharose 6B) can be used for measuring the Stokes' radius of biological particles within the range of 1,5 nm and 35 nm. The molecular weight determination of proteins is not very reliable with this method. Hepatitis sera have been chromatographed to measure the size of hepatitis associated antigen (Australia-antigen).

The radius of this antigen was determined to be 10,3 nm, which agrees with the results of electron microscopy and ultracentrifugation. The Stokes' radius of human serum IgM was found to be 10,6 nm.

Schon seit mehreren Jahren wird die Gelchromatographie als einfaches Verfahren zur Bestimmung von Mol-Gew. und Partikelgrößen verwendet¹. Speziell die Mol-Gew.-Bestimmung von Proteinen hat in der Biochemie eine gewisse Bedeutung erlangt. Da das Elutionsvolumen als Meßgröße des Verfahrens jedoch primär von der Teilchengröße abhängt und nur indirekt mit dem Mol-Gew. verknüpft ist, werden zutreffende Ergebnisse nur dann erhalten, wenn das untersuchte Protein von einer angenommenen Durchschnittsstruktur nicht allzu sehr abweicht. Besonders langgestreckte oder sehr kompakte Moleküle weisen daher ein anderes Elutionsvolumen auf als ihrem Mol-Gew. eigentlich entspräche². Die Gelchromatographie als analytische Methode ist also eher für die Bestimmung von Teilchengrößen als von Mol-Gew. zu verwenden.

Im Bereich der Proteine und anderer biologisch wichtiger Makromoleküle ist als Größenangabe besonders der Stokes'sche Radius geeignet. Er wird aus den Diffusionskoeffizienten berechnet, zu dem er umgekehrt proportional ist, und ist für viele bekannte Substanzen tabelliert³. Es stehen daher genug Eichsubstanzen zur Verfügung, um die Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom Stokes'schen Radius für ein Gel zu bestimmen, was für die weitere An-

wendung auf unbekannte Substanzen Voraussetzung ist. Während mit kovalent vernetzten Gelen (z. B. Sephadex G 200) Partikelradien über 10 nm nicht gemessen werden können, erlauben die makroporösen Cellulosegele die Bestimmung von Partikelradien bis 500 nm⁴. Auch die schon seit längerer Zeit im Handel befindlichen Agarosegele (Sepharose und Biogel A) haben einen relativ großen Anwendungsbereich, der für 2-proz. Agarosegel (z. B. Sepharose 2B) von 2 – 50 nm reicht⁵.

In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der Gelchromatographie die Größe eines Antigens bestimmt werden, das zunächst im Serum eines Australiers⁶, später im Serum vieler Hepatitiskranker⁷ gefunden wurde. Bei elektronenoptischen Untersuchungen von solchen Hepatitisseren wurden etwa 20 nm große „virusähnliche“ Partikel gefunden, von denen vermutet wurde, daß sie dieses Antigen darstellten⁸. Die Gelchromatographie als eine Methode der Größenmessung, bei der die antigenen Eigenschaften erhalten bleiben, sollte die Identität der 20-nm-Partikel mit dem Antigen (Hepatitis assoziiertes Australia-Antigen, HAA) überprüfen und unter Umständen bestätigen. Dazu mußte herausgefunden werden, welches Gel für diesen Größenbereich optimal geeignet ist, wie die Abhängigkeit zwischen dem Elutionsvolumen und

Sonderdruckanforderungen an Dr. W. GERLICH, Abt. f. Virologie d. Univ. D-6000 Frankfurt a. M., Paul-Ehrlich-Str. 40.

¹ H. DETERMANN, Gelchromatographie, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970.

² L. M. SIEGEL u. K. J. MONTY, Biochem. biophysica Acta [Amsterdam] **112**, 346 [1966].

³ P. ANDREWS, in: Methods of Biochemical Analysis **18**, 1–53, Interscience Publishers, New York, London 1970.

⁴ W. GERLICH, H. DETERMANN u. TH. WIELAND, Z. Naturforsch. **25 b**, 1235 [1970].

⁵ G. MAY, Arzneimittel-Forsch. **21**, 149 [1971].

⁶ B. S. BLUMBERG, H. J. ALTER u. S. VISNICH, J. Amer. med. Assoc. **191**, 101 [1965].

⁷ A. M. PRINCE, Lancet **II**, 462 [1969].

⁸ R. J. HIRSCHMAN, N. R. SHULMAN, L. F. BARKER u. K. O. SMITH, J. Amer. med. Assoc. **208**, 1667 [1969].

dem Stokes'schen Radius für dieses Gel verläuft und welche Verteilungskurve das Antigen an diesem Gel aufweist.

Material und Methoden

Sepharose 6B (Deutsche Pharmacia, Frankfurt am Main) wurde, von feinen Anteilen und gelöstem Gas befreit, als Suspension in eine Säule der Dimensionen 25×1000 mm (Pharmacia K 25/100 mit Durchflußadapter) gefüllt und bei 6 cm/h Durchflußgeschwindigkeit 90 cm hoch dicht gepackt, so daß ein Gelbettvolumen von $V_t = 468$ ml (volumetrisch gemessen) entstand. Als Elutionsmittel diente in allen Versuchen phosphatgepufferte Salzlösung (0,8% NaCl, 0,02 M Na-Phosphat pH 7,2, 0,5% Na-Azid in demineralisiertem Wasser), die mit 3 cm/h von unten nach oben durch das Gelbett gepumpt wurde.

Das Elutionsvolumen maximaler Konzentration V_e der Proteine Cytochrom C, Apoferritin und Chymotrypsin (Serva, Heidelberg) wurde durchflußphotometrisch (Uvicord II, LKB) bei 280 nm bestimmt, wobei jeweils 10 mg des Proteins in 5 ml Lösungsmittel in den Elutionsstrom eingeschleust wurden. Das Ausschlußvolumen der Gelpackung V_0 wurde mit Dextranblau 2000 (Pharmacia) zu 148 ml ermittelt.

Als Ausgangsmaterial für HAA dienten Seren von Patienten, die akut an Virushepatitis erkrankt waren, bzw. Plasma, das von der Blutbank in Frankfurt wegen seines Gehaltes an HAA aussortiert wurde. Es wurden nur Proben mit einem Gehalt von mehr als 40 γ /ml HAA verwendet.

Das Material wurde durch niedertouriges Zentrifugieren von Trübungen befreit, 15–20 ml davon wie oben gestartet, und das Eluat in 6,5-ml-Portionen fraktioniert. Die relativen Konzentrationen von IgM- und IgG-Globulin in den Fraktionen konnten durch radiale Immundiffusion in antikörperhaltigen Agar (Hyland Immunoplates) bestimmt werden. α -Makroglobulin stellt die Hauptkomponente des zweiten Peaks in der Photometerkurve dar (siehe Abb. 3). Serumalbumin wurde durch Elektrophorese auf Celluloseacetatfolie quantitativ nachgewiesen. Eine genaue Bestimmung der relativen Konzentration von HAA war mit Hilfe der Elektroimmunodiffusion nach LAURELL möglich⁹.

V_e' konnte so für diese 5 Substanzen in einem Lauf auf etwa 1% von V_t genau bestimmt werden.

Die verwendeten Dextrane mit enger Mol.-Gew.-Verteilung sind von K. A. GRANATH (Pharmacia, Uppsala) präpariert und charakterisiert worden¹⁰. Ihre Eignung als Eichsubstanzen für die Gelchromatographie hat sich bereits in früheren Untersuchungen erwiesen⁴. Die Dextrankonzentration im Säuleneluat wurde mit einem Differentialrefraktometer (Lamidur, Winopal-Forschungsbedarf, Isernhagen) registriert. Etwa 1 mg wurde jeweils aufgegeben.

V_e' wurde generell um das Volumen der Verbindungsschläuche und Meßzellen (etwa 1% von V_t) sowie um das halbe Startvolumen zum korrigierten Elutionsvolumen V_e vermindert.

Ergebnisse

Bei der Chromatographie von HAA-haltigen Seren an Sephadex G 200 wird das Antigen mit dem Ausschlußvolumen eluiert, so daß mit diesem Gel keine definitive Aussage über die Größe von HAA zu erhalten ist. An 2-proz. Agarosegel (Sephrose 2B) wird HAA relativ spät zusammen mit den meisten anderen Serumproteinen eluiert. Unter Verwendung der von SCHÄFER und MAY angegebenen Eichkurve⁵ ließ sich aus dem Elutionsvolumen für den Stokes'schen Radius ein Wert zwischen 10 und 15 nm abschätzen. Der großporige Volumenanteil des 2-proz. Gels wird also bei diesem Problem nicht benötigt. Durch den breiten Fraktionierbereich wird jedoch die Trennschärfe bezogen auf die Partikelgröße reduziert, so daß ein engerporiges Agarosegel wie Sepharose 6B (S 6B) für eine möglichst genaue Größenmessung von HAA am geeignetsten erschien.

Zunächst mußte die Abhängigkeit des Elutionsvolumens oder einer daraus abgeleiteten Größe vom Stokes'schen Radius untersucht werden. Zur Eichung wurden verschiedene Proteine und einige Dextranproben mit enger Mol.-Gew.-Verteilung einzeln chromatographiert und das Elutionsvolumen V_e bestimmt, bei dem die maximale Konzentration der Substanz im Eluat auftritt.

Weitere Eichpunkte lieferte der spezifische Nachweis einiger Serumproteine, die neben HAA im Eluat der untersuchten Seren vorkommen. Neben V_e wurde auch der K_{av} -Wert ermittelt, der die speziellen Volumenverhältnisse der verwendeten Gelpackung eliminiert und für jede Substanz an einem bestimmten Gel charakteristisch ist.

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0).$$

Die zur Eichung des Gels verwendeten Daten sind in Tab. 1 zusammengestellt. Unter Verwendung dieser Werte kann K_{av} als Funktion von r_s über den gesamten Fraktionierbereich des Gels dargestellt werden (Abb. 1); diese Funktion wird im folgenden mit $K_{av} = f(r_s)$ bezeichnet. Wie bei den meisten Gelen

⁹ G. MAY u. W. GERLICH, in Vorbereitung.

¹⁰ K. A. GRANATH u. B. E. KVIST, J. Chromatog. **28**, 69 [1968].

Nr.	Substanz	r_s (nm)	M ($\cdot 10^{-4}$)	K_{av}	Nachweismethode
1	Cytochrom C	1,64	1,2	0,88	UV
2	α -Chymotrypsin	2,24	2,3	0,81	UV
3	Serumalbumin	3,55	6,7	0,67	UV-Elektrophorese
4	IgG-Globulin	5,15	15,8	0,56	Ringdiffusion
5	Apoferritin	6,1	48	0,46	UV
6	α -Makroglobulin	8,8	82	0,325	UV-Elektrophorese
7	Dextran 220	9,5	22	0,28	Refraktometer
8	IgM-Globulin	—	100	0,25	Ringdiffusion
9	Dextran 457	14,1	45,7	0,185	Refraktometer
10	Dextran 1040	20,9	104	0,10	Refraktometer
11	Dextran 2300	31,4	230	0,02	Refraktometer

Tab. 1. Eichsubstanzen für die Gelchromatographie und gemessene K_{av} -Werte an S 6B. Die Angaben für die Proteine sind von ANDREWS übernommen³.

verläuft $K_{av} = f(r_s)$ auch für S 6B mit zunehmendem r_s immer flacher, so daß die absolute Genauigkeit der Größenmessung bei großen r_s immer geringer wird. Zwischen K_{av} und $\log r_s$ besteht keine strikte Linearität; die Meßpunkte streuen in dieser Darstellungsform erheblich stärker als in Abb. 1. Die Ausschlußgrenze ergibt sich zu etwa 35 nm, während die untere Grenze des Fraktionierbereichs bei etwa 1 nm liegt.

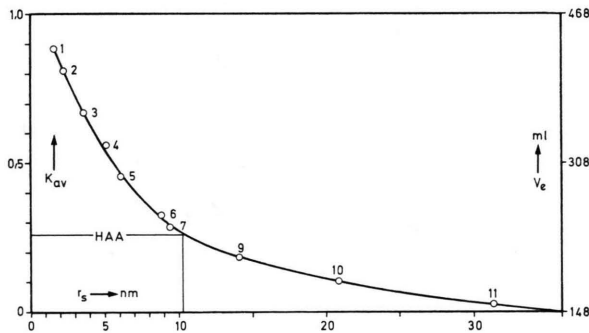


Abb. 1. Zusammenhang zwischen dem Stokes'schen Radius r_s und dem K_{av} -Wert bei der Gelchromatographie an S 6B. Die Zahlen geben die in Tab. 1 angeführten Substanzen an.

In Abb. 2 ist K_{av} auch in Abhängigkeit vom Logarithmus des Mol-Gew. dargestellt. Hierbei wurden nur die Proteine, nicht aber die Dextrane berücksichtigt. Es wurde eine Linearität zwischen K_{av} und $\log M$ angenommen, die allerdings für den Bereich über 400.000 nicht gut erfüllt ist. Bei Extrapolation der Geraden wird die Ausschlußgrenze bei einem Mol-Gew. von etwa 10^7 erreicht.

Die Auftrennung eines Hepatitisserums und die Verteilung von HAA an S 6B ist in Abb. 3 dargestellt. Die Trennung von IgG und Serumalbumin ist an S 6B nicht so vollständig wie an Sephadex G 200, das IgG ist in der Photometerkurve nur als Schulter

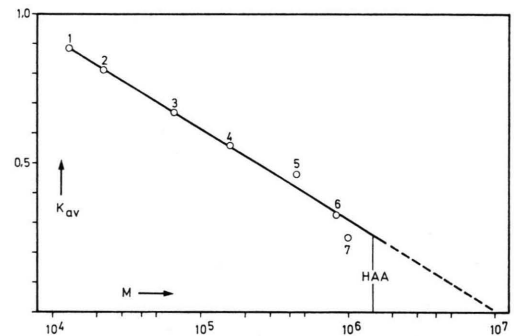


Abb. 2. Zusammenhang zwischen dem Molgewicht M einiger Proteine und dem K_{av} -Wert an S 6B.

am Albuminpeak erkennbar. Im höher molekularen Bereich wird jedoch an S 6B noch eine partielle Auftrennung von Lipoproteinen, IgM, HAA und α -Makroglobulin beobachtet, während an Sephadex G 200 diese Substanzen alle ausgeschlossen und gemeinsam eluiert werden. Wie der Nachweis durch Immunpräzipitation gegen spezifische Antiseren zeigte, werden IgM und IgG vollständig voneinander getrennt.

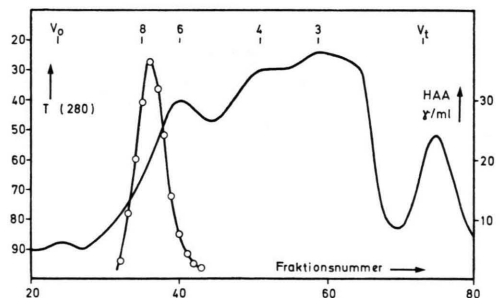


Abb. 3. Gelchromatographische Auftrennung von 16 ml Humanplasma an S 6B. Die durchgezogene Linie zeigt die Registrierkurve des Durchflußphotometers bei 280 nm. Die Meßpunkte ($\cdot - \cdot$) geben die HAA-Konzentration in γ/ml wieder. Am oberen Bildrand sind die Elutionsmaxima der in Tab. 1 näher bezeichneten Proteine markiert.

Material	Nummer	V_e [ml]	K_{av} [ml]	r_s [nm]	α -Mg V_e [ml]
Plasma	67623	232	0,26	10,3	252
Plasma	92246	237	0,28	9,8	255
Serum	8286	231	0,26	10,3	251
Serum	8645	225	0,24	10,8	248
Serum	3212	230	0,26	10,3	253
Mittelwert		231	0,26	10,3	252
Standardabweichung		2,5	0,013	0,32	2,7

Tab. 2. V_e - und K_{av} -Werte verschiedener HAA-Proben an S 6B und daraus bestimmte r_s -Werte. Zum Vergleich ist V_e auch für α -Makroglobulin ($r_s=8,8$) angegeben.

Die HAA-Konzentration im Eluat folgt annähernd einer Normalverteilung um V_e mit einer Standardabweichung von etwa 12 ml, bzw. etwa 0,04 K_{av} -Einheiten. Der Peak ist bei HAA nicht breiter als bei den verwendeten größeinheitlichen Eichsubstanzen. Daraus folgt, daß r_s eine geringere Streuung aufweisen sollte, als der Meßgenauigkeit des Verfahrens entspricht. In Tab. 2 sind die Werte, die bei der Chromatographie von 5 verschiedenen HAA-Proben erhalten wurden, zusammengestellt. Demnach hat r_s im Mittel den Wert 10,3 nm mit einer Standardabweichung kleiner als 0,3 nm. Die Unterschiede bei den einzelnen Proben liegen innerhalb der Meßgenauigkeit. Der Diffusionskoeffizient ergibt sich entsprechend $r_s \cdot D = 21,3 \cdot 10^{-7}$ zu $(2,05 \pm 0,08) \cdot 10^{-7}$ cm²/sec. Das Mol-Gew. M wird aus Abb. 2 zu $(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$ abgelesen.

Die Elutionsausbeute von HAA war quantitativ. Eine gewisse Tendenz zur Elutionsverschleppung (Schwanzbildung) nach höheren Fraktionen war erkennbar, aber prozentual nicht bedeutsam.

Zu IgM wurden in der Literatur keine Angaben für D bzw. r_s gefunden. Hier wurde für das Elutionsmaximum r_s zu 10,6 nm und D zu $2,0 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec bestimmt. Die Elutionskurve zeigte jedoch eine deutliche Asymmetrie bei höheren Fraktionen, so daß auf das Vorhandensein kleinerer Moleküle mit der Antigenität von IgM geschlossen werden muß.

Diskussion

Da V_e ohne speziellen Aufwand auf etwa 1% von V_t genau gemessen werden kann, wird die Genauigkeit der gelchromatographischen Größenbestimmung in erster Linie von der Genauigkeit der Größenangaben für die Eichsubstanzen limitiert.

Tatsächlich stellt die Beschaffung geeigneter Eichsubstanzen das relativ größte Problem dar, da nur wenige größere Partikel mit bekanntem r_s bzw. D im Handel sind. Neben den hier verwendeten Substanzen können noch große Proteinkomplexe oder Viruspartikel als Eichsubstanzen dienen, wenn sie hochgereinigt in Milligrammengen verfügbar sind.

Die hier vorgelegte Eichkurve (Abb. 1) dürfte jedoch allgemein anwendbar sein, da die Trenncharakteristik für ein gegebenes Gel meist relativ stabil ist¹. Gewisse Schwankungen zwischen einzelnen Gelpräparationen können jedoch nicht ausgeschlossen werden, so daß bei Anwendung der hier angegebenen Eichkurve zumindest ein annähernd gleich großes Referenzpartikel zum Vergleich mitgeprüft werden sollte.

Abb. 1 zeigt, daß S 6B zur Untersuchung und Auftrennung von Partikeln mit einem Radius zwischen 1,5 und 35 nm verwendet werden kann. Für $r_s < 6$ nm erlauben jedoch die kovalent vernetzten Gele (Sephadex oder Biogel P) bessere Auftrennungen und genauere Größenbestimmungen. Für $r_s > 20$ nm scheinen dagegen weiterporige Agarosegele besser geeignet zu sein, da hier $K_{av} = f(r_s)$ sehr flach verläuft. So ist S 6B am besten für die Charakterisierung und Reinigung von Partikeln geeignet, deren Radius zwischen 6 und 20 nm liegt. In diesem Bereich können zwei Substanzen, deren Radien mindestens um den Faktor 1,8 differieren, mit der beschriebenen Vorrichtung noch vollständig getrennt werden.

Der hier gemessene Radius von HAA ergab eine gute Übereinstimmung mit dem Wert, der von SCHÖBER aus der Sedimentationskonstanten und der Dichte errechnet wurde¹¹. Der Diffusionskoeffizient kann durch die hier angewandte Methode wahrscheinlich genauer gemessen werden als etwa durch die Immundiffusion, mit der BOUVIER D zu $2 \cdot 10^{-7}$ bestimmte¹².

Bei einem kompakten, annähernd kugelförmigen Partikel wie HAA stimmt r_s auch mit dem elektronenoptisch gemessenen Radius überein¹¹.

Es scheint jedoch keine generelle Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen beider Methoden zu bestehen. So stellt IgM im Elektronenmikroskop

¹¹ A. SCHÖBER u. R. THOMSEN, Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. **224**, 37 [1971].

¹² G. L. LE BOUVIER u. R. W. MCCOLLUM, Advances in Virus Research **16**, 364 [1970].

¹³ S. E. SVEHAG, B. BLOTH u. B. CHESEBRO, J. exp. Medicine **127**, 399 und 749 [1968].

ein weit aufgefächertes Molekül mit einem mittleren Durchmesser von 30 nm dar¹³, während r_s hier zu 10,6 nm bestimmt wurde. Die voluminöse und flexible Struktur dieses Moleküls führt möglicherweise zu einer räumlichen Aufweitung bei der elektronenmikroskopischen Präparation. r_s als hydrodynamisch definierte Größe entspricht dagegen den gemittelten Dimensionen in Lösung, also unter physiologischeren Bedingungen, so daß beide Beobachtungen einander nicht ausschließen müssen.

Die gelchromatographische Mol-Gew.-Bestimmung von HAA ergab einen deutlich zu niedrigen Wert, denn aus der Dichte und der Sedimentationskonstanten errechnet sich M zu $2,5 \cdot 10^6$. Dies beruht auf der kompakten Struktur von HAA, während die Vergleichsproteine α -Makroglobulin und besonders IgM mit einem ähnlichen K_{av} -Wert eine aufgefächerte Struktur besitzen. Man muß wahrscheinlich gerade im Bereich sehr großer Proteine mit stärkeren Unterschieden in der Tertiär- und Quartärstruktur rechnen, so daß auch die Verwendung einer größeren Zahl von Eichsubstanzen für den Einzelfall keine bessere Zuverlässigkeit der so gewonnenen Mol-Gew.-Angaben garantieren würde.

Deswegen scheinen die Agarosegele den Anwendungsbereich der gelchromatographischen Mol-Gew.-Bestimmung nur im Sinne einer groben Abschätzung nach oben erweitern zu können, auch wenn, wie LEHMANN berichtet, über einen weiten Bereich eine lineare Beziehung zwischen $\log M$ und V_e beobachtet wird¹⁴.

Die Gelchromatographie als Verfahren zur Größenbestimmung hat den Vorteil, daß die zu prüfende Substanz in einem komplexen Gemisch vorliegen kann, wenn nur eine spezifische Nachweismethode zur Verfügung steht. Da die biologische Ak-

tivität bei der Untersuchung erhalten bleibt, ist eine sichere Zuordnung zwischen dem Radius und der wirksamen Komponente ohne vorherige Reinigung möglich, was für die Elektronenmikroskopie normalerweise nicht zutrifft. Gegenüber der Größenbestimmung aus Ultrazentrifugendaten scheint die Gelchromatographie der direktere, apparativ einfachere Weg zu sein, da dort sich mehrere Parameter gegenseitig beeinflussen. Die einfache Filtration mit Membranen definierter Porenweite wird im Anwendungsbereich von S 6B ebenfalls nicht so genaue Resultate liefern.

Die Messung von D durch Verfolgung der freien Diffusion erfordert ein absolut reines Produkt, so daß speziell auch für diese Bestimmung die Anwendung der Gelchromatographie nützlich erscheint. Da eine genaue Kenntnis von D auch für eine exakte Bestimmung des Mol-Gew. nützlich ist, gewinnt diese Größe eine zusätzliche Bedeutung. r_s läßt sich auch mittels Exklusions-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach FELGENHAUER bestimmen¹⁵. Diese Methode entspricht im Prinzip der Gelchromatographie, da auch hier die Porengrößenverteilung eines Gels dem Meßsystem zugrundeliegt.

Immer dann, wenn eine hochmolekulare Substanz in einem komplexen Gemisch zunächst nur durch ihre biologische Aktivität charakterisiert ist, vermag eine exakte Anwendung der Gelchromatographie eine Information über die Größe zu liefern, die auf andere Weise nicht so zuverlässig oder genau erhalten wird.

Herrn Prof. Dr. G. MAY verdanke ich die Anregung zu dieser Arbeit und großzügige Förderung. Herrn Prof. Dr. H. DETERMANN danke ich für die Überlassung der wertvollen Dextranproben sowie für die freundliche Kritik bei der Abfassung des Manuskripts.

¹⁴ F. G. LEHMANN, Clin. Chem. Acta **28**, 335 [1970].