

## **Kapillar- / Nano-HPLC**

### **- Sterische Ausschlußchromatographie (SEC) für die Proteomanalyse -**

C. Klein <sup>1</sup> und P. Földi <sup>1/2</sup>

**Einleitung:** In der biochemischen Forschung sind Elektrophorese, z.B. in Polyacrylamid-Gelen (PAGE), und Flüssigkeitschromatographie, z.B. HPLC, von je her zwei sich sehr effizient ergänzende Methoden. Es ist sicherlich falsch diese beiden als konkurrierende Trenntechniken für die Analyse und Charakterisierung von Proteinen oder Nukleinsäuren anzusehen.

Viele der in jüngster Zeit in der Gentechnik und Biotechnologie erzielten Ergebnisse bzw. großen Fortschritte wären ohne die 2-dimensionale Gelelektrophorese als analytische Technik nicht möglich gewesen. Dies gilt vor allem auch für die Proteomanalyse. Unter „Proteomics“ versteht man die Analyse der zu gegebenen Zeitpunkten in einer lebenden Zelle vorkommenden Proteine, quasi also Momentaufnahmen des gesamten Proteinpatterns. Für diese Problemstellung ist wegen ihrer einzigartigen, hohen Auflösung und wegen ihrer relativen hohen Empfindlichkeit die 2-dimensionale Gelelektrophorese derzeit noch die am besten geeignete Technik. So können in einem einzigen Experiment über 1000 Spots bzw. Proteine aufgelöst bzw. analysiert werden [1].

Nachteile elektrophoretischer Techniken sind jedoch der relativ große, notwendige Arbeitsaufwand, die lange Versuchsdauer, Nicht-Detektierbarkeit von Peptiden und kleineren Proteinen ( $\leq 10\,000$  D) [2], nur bedingte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, sowie oft der Verlust der biologischen Aktivität speziell von Enzymen. Es liegt daher nahe diese Nachteile durch die Vorteile der HPLC wie z.B. einfache Handhabung, Schnelligkeit, leichte Quantifizierbarkeit etc. möglichst bei noch höherer Empfindlichkeit zu kompensieren.

Multidimensionale Kapillar-HPLC, besser, eine Kaskade der jeweiligen biochemischen Problemstellung gezielt angepaßten Reihenfolge chromatographischer Techniken, wie sterische Ausschluß- (SEC), Ionenaustausch- (IEX), Hydrophobic-Interaction (HIC), aber auch Reversed-Phase-Chromatographie (RPC), scheint deshalb eine sinnvolle, effiziente Ergänzung zur 2-dimensionalen Gelelektrophorese nicht nur für die Analyse von Proteomen zu sein.

Die folgenden Experimente stellen daher die einfache Handhabung, die Schnelligkeit, besonders jedoch die überlegene Empfindlichkeit der sterischen Kapillar-Ausschlußchromatographie bzw. „size exclusion chromatography (SEC)“ beim Isolieren, Um- und Entsalzen, sowie bei der Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen [3] und Polynukleinsäuren erneut unter Beweis [4 - 6].

**Materialien und Instrumente:** Die verwendeten Puffersubstanzen (p.A) und Lösungsmittel (LiChrosolv) wurden von Merck (Darmstadt), bezogen. Sämtliche Marker-Proteine der Firmen Merk (Darmstadt), Fluka (Buchs), Roche Diagnostics (Mannheim) und Serva (Heidelberg) wurden auf einer konventionellen LC-Säule (2,6 x 60 cm) gefüllt mit Sephacryl S-200 HR von Amersham-Pharmacia (Freiburg) vorgereinigt. Die Eluenten wurden steril filtriert und kontinuierlich mit Helium entgast. Die verwendeten *NovoGROM-*

---

<sup>1</sup> FH Niederrhein, Krefeld, <sup>2</sup> GROM Analytik + HPLC GmbH, Herrenberg

Kapillarsäulen waren von GROM, Herrenberg, in einer Kooperation mit TOSOH BIOSEP; Stuttgart, mit Super SW 2000 bzw. Super SW 3000 gepackt worden. Das HPLC-System bestand aus einer Microflow Pump MicroPro (Sunchrom, Friedrichsdorf), einem Nano-Injektor mit 30 bzw. 300 nL Schleife (Upchurch, Oak Harbor, WA, USA), und einem Spectroflow Spectra Focus UV-Detektor mit PC 1000 Integrationssoftware und Intel 486/66 PC.

**Ergebnisse und Diskussion:** In früheren Arbeiten wurde beschrieben, daß der Ersatz einer Konventionellen HPLC-Säule mit einem Innendurchmesser von 4,6 mm durch eine Kapillarsäule mit 50 µm ID z.B. für die Analyse von Pharmaka oder Benzoaten eine Steigerung der Empfindlichkeit um mehr das 8 000-fache ermöglicht [7]. Dies entspräche bei Verwendung von Kapillarsäulen von 500 µm und 300 µm ID einem 83- bzw. 232-fachen Gewinn an Empfindlichkeit (Abb. 1). Da für die Erstellung einer Eichgeraden für die Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen zunächst jedoch die Chromatogramme auf einer 300 x 4,6 mm Säule, die durch eine 150 x 0,1 mm Kapillare mit einer Durchflußzelle von 15 µL und einer Schichtdicke von 10 mm verbunden war, durchgeführt worden waren, für die entsprechenden Experimente mit den Kapillarsäulen aber nur eine Fused-Silica-Durchflußzelle von 4nL mit einer Schichtdicke von 0,2 mm

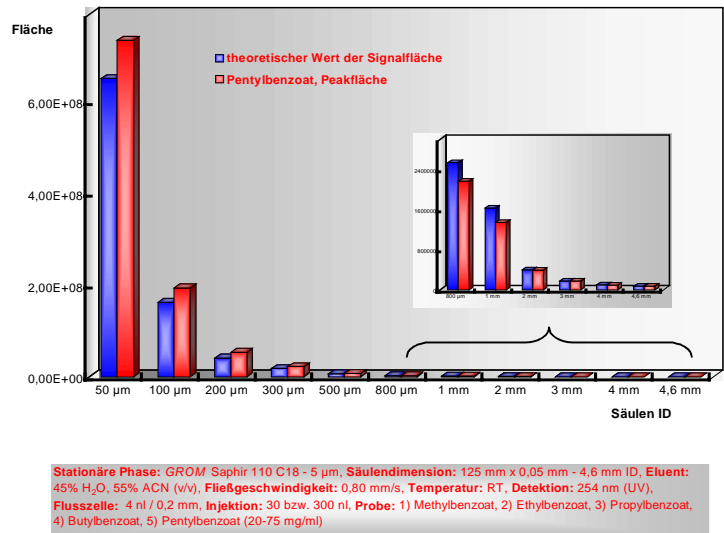
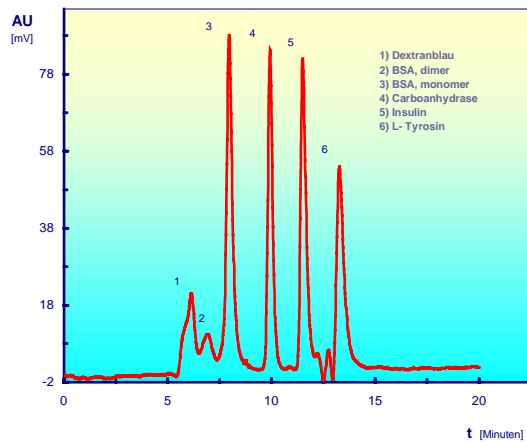


Abb.1 **8000-fach gesteigerte Empfindlichkeit**  
- Säuleninnendurchmesser vs. Empfindlichkeit -

zur Verfügung stand, konnte bei diesen Versuchen die Empfindlichkeit folglich nur um das ~ 50-fache gesteigert werden (Abb 2, 3). Hätte jedoch eine sogenannte nano-LC-Durchflußzelle mit einer Schichtdicke von 10 mm zur Verfügung gestanden, so wäre der Gewinn an Empfindlichkeit auch bei diesen Experimenten mehr als das 230-fache gewesen. Dies zeigt erneut, daß die Empfindlichkeit nicht nur vom Säuleninnendurchmesser sondern auch in Einklang mit dem Lambert-Beer'schen-Gesetz von der Schichtdicke der Durchflußzelle des verwendeten Detektors abhängig ist.

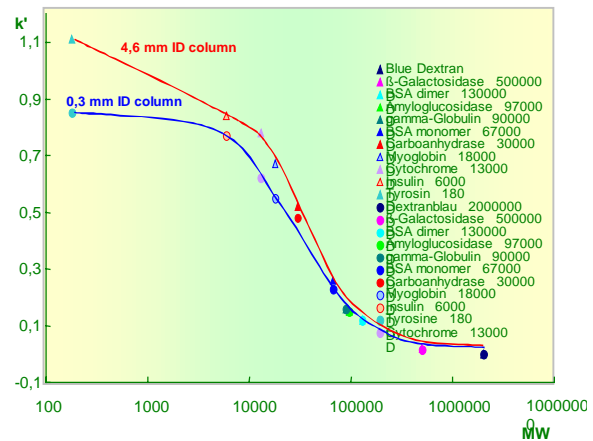
Es ist jedoch zu bedenken, daß für den Nachweis eines Proteins durch „silver staining“ auf einem 2-dimensionalen Gel im Allgemeinen mindestens 2ng pro Proteinbande aufgetragen werden müssen [8], auf die 300 x 0.3 mm Säule waren hingegen nur 1,5 ng in 300 nL aufgetragen worden, was einer Nachweisgrenze von weniger als 0,02 ng ( $\geq$  3-faches Signal/Rauschverhältnis) entspricht. Somit ist die Nachweisgrenze von Proteinen durch Kapillar-HPLC wesentlich niedriger als die entsprechender 2-D Elektrophorese-techniken.

Trotz ihrer im Vergleich mit anderen Separationstechniken relativ geringen Trenneffizienz besteht eine besondere Stärke der „sterischen Ausschlußchromatographie (SEC) darin, daß in einem einzigen chromatographischen Arbeitsschritt die Proteine z.B. eines Zell- oder Urinextraktes leicht „umgesalzt“ bzw. „entsalzt“, werden können. Sie werden hierbei nicht nur gereinigt bzw. angereichert, sondern es kann zugleich auch noch ihr Molekulargewicht bestimmt werden, so zuvor die Kapillarsäule mit entsprechenden Markerproteinen



Stationäre Phase: TOSOH Super SW 2000; Säulendimension: 300 mm x 0,5 mm;  
 Eluent: 0,1 M Na-Phosphat pH 6,8 - 0,1 M NaCl; Fließgeschwindigkeit: 0,35 mm/s;  
 Temperatur: RT; Detektion: 206 nm (UV); Flusszelle: 4 nL / 0,2 mm; Injektion: 300 nL  
 Proteingemisch (0,1 - 0,4 mg/mL)

Abb. 2 Sterische Ausschlusschromatographie eines Proteinstandardgemisches

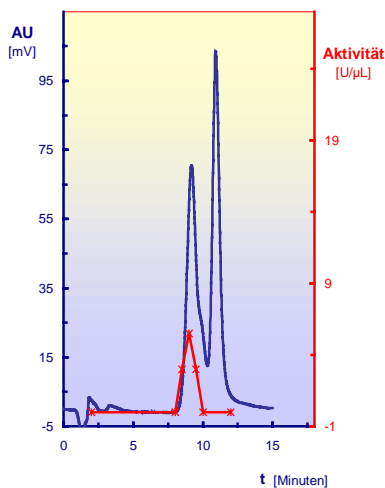


Stationäre Phase: TOSOH Super SW 2000 - 4 µm, Säulendimension: 300 mm x 4,6 mm bzw. 0,3 mm;  
 Eluent: 0,1 M Na-Phosphat pH 6,8 - 0,1M NaCl; Fließgeschwindigkeit: 0,35 mm/s;  
 Temperatur: RT; Detektor: 206 nm (UV); Flusszelle: 15 µL / 10 mm bzw. 4 nL / 0,2 mm;  
 Injekt ion: 10 µL bzw. 300 nL Proteinlösung (- 0,1-0,5 mg/mL)

Abb. 3 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen durch Kapillar-SEC

„geeicht“ worden war. Ein weiterer Vorteil der Flüssigkeitschromatographie, im vorliegenden Fall der Kapillar-SEC, ist es, daß vielfach im Gegensatz zur Elektrophorese in Polyacrylamidgelen die biologische Aktivität selbst von relativ instabilen Enzymen erhalten bleibt (Abb. 4).

„Umsalzen“ ist hierbei gleichbedeutend damit, daß das die Proteine enthaltende Eluat z.B. genau auf die Ionenstärke und Ionenspezies eingestellt ist, die für den nächsten Trennschritt einer chromatographischen Kaskade, z.B. für Ionenaustausch- oder Hydrophobic-Interaction-Chromatographie benötigt wird.



Stationäre Phase: TOSOH Super SW 2000 - 4 µm Säulendimension: 300 mm x 0,3 mm; Eluent: 0,1 M Na-Phosphat pH 6,8 - 0,1M NaCl; Fließgeschwindigkeit: 0,35 mm/s; Temperatur: RT; Detektion: 206 nm (UV); Flusszelle: 4 nL / 0,2 mm; Probe: 300 nL β-Galactosidase (0,45 mg/mL)

Abb. 4 Schnelle Produktanalyse eines β-Galactosidase Präparates durch SEC

„Entsalzen“ hingegen bedeutet, daß die SEC-Säule zuvor z.B. in einem flüchtigen Puffer niedriger Ionenstärke konditioniert worden ist, und interessierende Proteine nach der Elution nun leicht per Reversed-Phase-Kapillar-HPLC Sequenz- und Strukturuntersuchungen zugeführt werden können [9].

Daß ferner die Kapillar-SEC auch zur Analyse von Proteinen, für ein Screening oder eine schnelle, hoch empfindliche Produkteingangskontrolle z.B. von Insulinen oder kommerziell erhältlichen Interferonen vorzüglich geeignet ist, wird durch Abb. 5 erneut unter Beweis gestellt.

**Zusammenfassung / Fazit:** Wie beschrieben sind die Vorteile und Stärken der konventionellen sterischen Ausschlusschromatographie leicht auf die Kapillar-SEC zu übertragen und und zwar bei wesentlich höherer Empfindlichkeit, als dies bisher möglich war. Ferner war und ist es Ziel bereits durchgeführter und noch anstehender Experimente, zu zeigen, daß für die Analyse von Proteomen die Vorteile der klassischen,

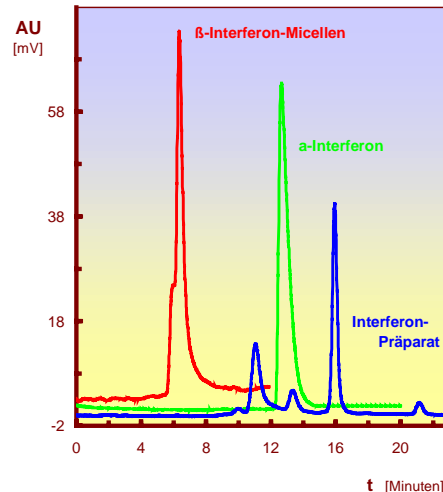
bis dato im biochemischen Labor angewandten chromatographischen Techniken wie SEC, IEX, HIC, RPC etc. mit den Vorteilen der schnelleren, hochempfindlichen modernen Kapillar-HPLC leicht vereinigt werden können [10]. Um jedoch für PROTEOMICS wie bei 2-dimensionale Gelelektrophorese quasi in einem Arbeitsgang mehr als 1000 Proteine auflösen bzw. analysieren zu können, ist es unabdingbar die einzelnen chromatographischen Schritte vollautomatisch, mittels leicht zu bedienender d.h. bequemer Software miteinander zu einer Kaskade, die oft gar zu vollmundig „multi-dimensionale HPLC“ genannt wird, zu verbinden.

Es wird daher darauf hingewiesen, daß hierfür zwar die einzelnen Komponenten sowohl der Hardware als auch der Software von entsprechenden Her-

stellern angeboten werden, jedoch bedauerlicherweise die Kombination dieser Module allgemein käuflich immer noch nicht zur Verfügung steht.

### Literatur:

- 1) P.H. O'Farrell, J. Biol. Chem., **250**, 407-4021 (1975)
- 2) M. Pfordt, BIOforum **7-8**, 492-494, (2001)
- 3) Y. Kato, M. Sasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushige and K. Matsubara. J. Chromatogr., **266**, 341-349 (1983)
- 4) L. Graeve, P. Földi, J. Kruppa, Biochem. Biophys. Res. Commun., **107**, 1559-1565 (1982),
- 5) L. Graeve, P. Földi, J. Kruppa, LC-Magazine, **2**, 848-853 (1984),
- 6) R. Dornburg, P. Földi, P.H. Hofschneider, J. of Chromatogr., **296**, 379-385 (1984)
- 7) M. Breyer, M. Twele, P. Földi, LaborPraxis, **9**, 18-22 (2001)
- 7) H.P. Schmauder, Methoden der Biotechnologie, (1<sup>st</sup> ed.), Fischer Verlag, 1999 ff. (1994)
- 9) F. Lottspeich, H. Zobras (Hrsg.), Bioanalytik (1<sup>st</sup> ed.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 201 ff. (1998)
- 10) K. Wagner, K. K. Unger, GIT Spezial „Seperation“, **1**, 14-17, (2001)



Stationäre Phase: TOSOH Super SW 2000; Säulendimension: 300 mm x 0,3 mm;  
 Eluent: 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 6,8 - 0,1M NaCl; Flussrate: 1,48 µL/min;  
 Temperatur: ~ 21° C; Detektion: 206 nm (UV); Flusszelle: 4 nL / 0,2 mm; Injektion:  
 300 nl Proteinlsg.

Abb. 5

**Schnelles Screening von Interferonpräparaten mittels Kapillar-SEC**