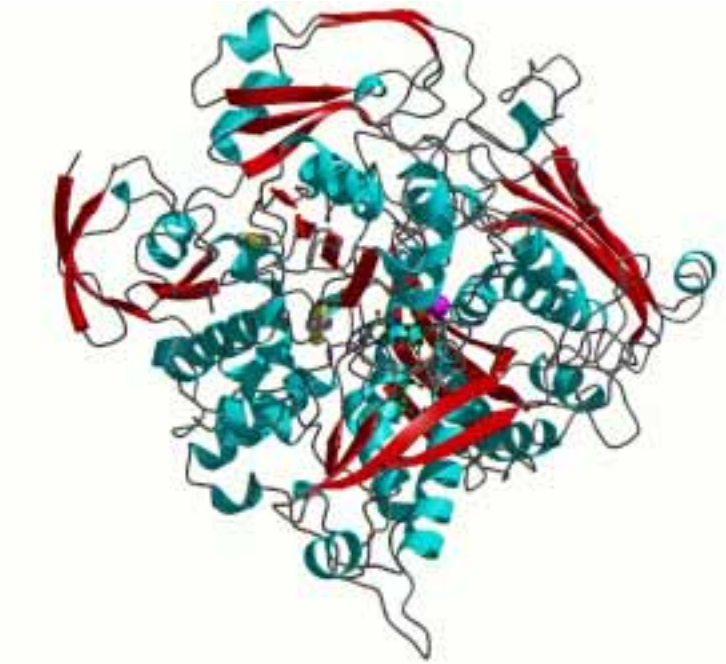
Elektrophorese von Proteinen I

H.Schlichting

Elektrophorese dient zur Analyse von Proteinen



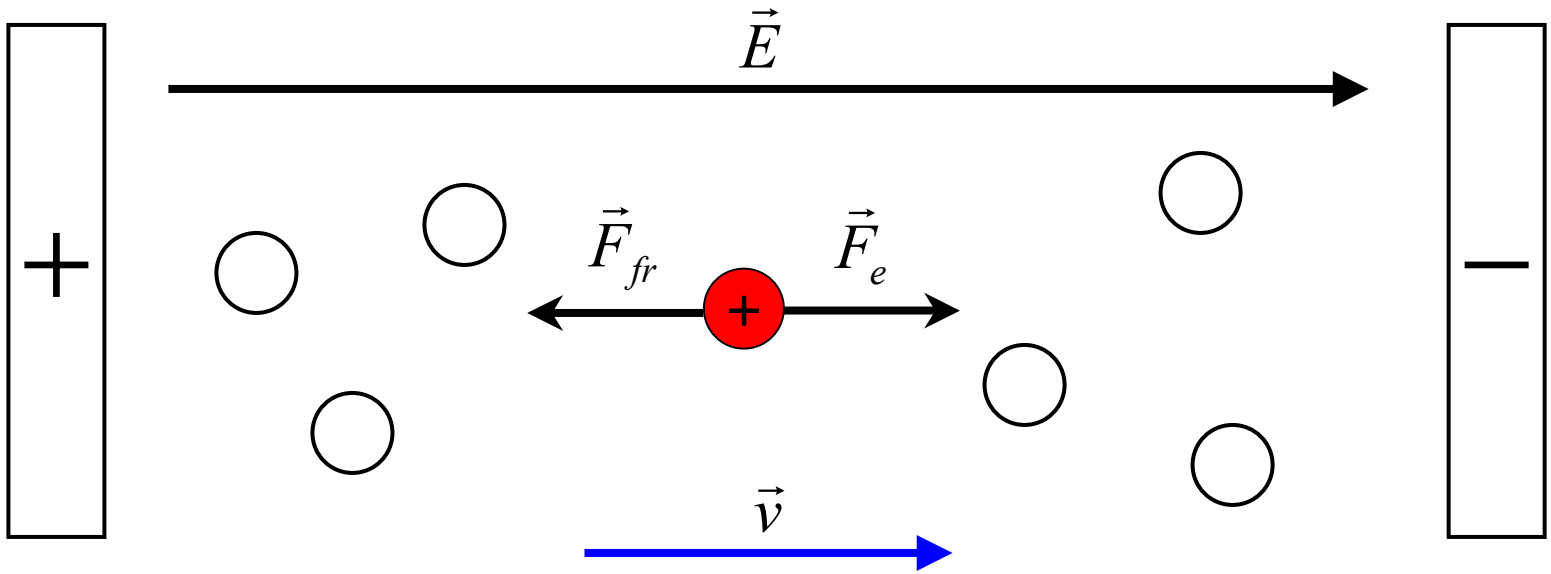
Proteine

- bestehen aus 50 – 5000 Aminosäuren (20 Typen)
- haben Molekulargewicht 5 – 500 kDa
- sind ausgestreckt 20 – 1000 nm lang
- sind zunächst ungeladen, jedoch mit inhomogener Ladungsverteilung

Übersicht

- Bewegung von Ionen (Proteine) im freien Elektrolyten
  - Leitfähigkeit
  - Hydrathülle
- Bewegung von Ionen (Proteine) in Gelen
  - Ogston Modell
  - Reptation Modell
- Elektrophoretische Technik
  - Gelbildung
  - Ionenbeweglichkeit

Bewegung eines positiven Ions im **freien** Elektrolyten



$$F_{fr} = f_c \cdot v$$

Reibungs-Kraft

$$F_e = q \cdot E$$

Elektrostatische Kraft

$$F_e = F_{fr}$$

Gleichgewicht

Definition der Beweglichkeit

Durch Kraft verursachte Bewegung eines Körpers
in einem Medium mit Reibung,
die durch die Bewegung verursacht wird:

Kräfte-Gleichgewicht $F_e = F_{fr}$

Da Kräfte-Gleichgewicht herrscht, ist die Bewegung gleichförmig,
also nicht beschleunigt, solange die Feldstärke konstant bleibt.
Die Geschwindigkeit ist konstant.

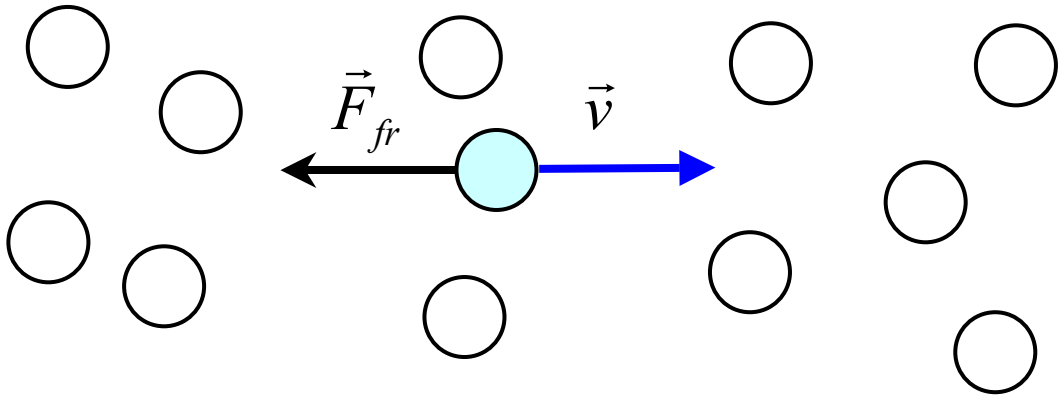
Konstante Geschwindigkeit $v = \mu \cdot E$

Beweglichkeit $\mu := \frac{v}{E}$

Bewegungskräfte durch viskose Reibung

Die Proteine bewegen sich in einer "zähen" Flüssigkeit.
Diese verursacht Reibungskräfte, ähnlich der
viskosen, laminaren Reibung in einer Flüssigkeit.

Bewegung in Flüssigkeiten: Das Stokessche Gesetz



Reibungskraft auf eine makroskopische ungeladene Kugel
bei laminarer Bewegung in einer freien Flüssigkeit

Stokessches Gesetz $F_{fr} = 6\pi r \cdot \eta \cdot v$

Dynamische Viskosität η

Die Viskosität einer Flüssigkeit

Dynamische Viskosität η

Die Viskosität ist die Eigenschaft eines Gases oder Flüssigkeit die dessen Zähigkeit beschreibt.

Hohe Viskosität -> zähflüssig

Niedrige Viskosität -> dünnflüssig

Einheit Pa s (Pascal Sekunde) = N s / m^2

Luft	17,2	µPas
Wasser	1,002	mPas (25C)
Ethanol	1,2	mPas
Olivenöl	80,8	mPas
Glycerin	1480	mPas

Stokessches Modell der Beweglichkeit im freien Elektrolyten

Stokessches Modell der Bewegung eines Ions im Elektrolyten:

Das Ion verhält sich wie eine Kugel die an andere Atome in der Flüssigkeit stößt und dadurch abgebremst wird.
Elektrische Kräfte spielen für die Reibung keine Rolle.

$$F_e = F_{fr} \qquad q \cdot E = 6\pi r \cdot \eta \cdot v$$

Resultierende Beweglichkeit $$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r \cdot \eta}$$

Weitere Annahmen:

Kugelförmiges Ion $$m = \frac{4}{3}\pi\rho \cdot r^3 \qquad r \propto m^{\frac{1}{3}}$$

Homogene Ladungsverteilung $$q \propto m$$

Resultierende Beweglichkeit $$\mu \propto m^{\frac{2}{3}}$$

Resultate des Stokesschen Modells

Beweglichkeit des Ions im freien Elektrolyten $\mu \propto m^{\frac{2}{3}}$

Ergebnis des Modells:

Die Beweglichkeit nimmt zu mit steigender Masse.

Bei konstanter Feldstärke bewegen sich schwere Ionen schneller als leichte !

Das steht im krassen Widerspruch zum Experiment,

in Realität ist der Massen-Exponent

null (freier Elektrolyt) oder

negativ (Gel)

Stab-Modell für Ionen-Bewegung im freien Elektrolyten

Stab-Modell:

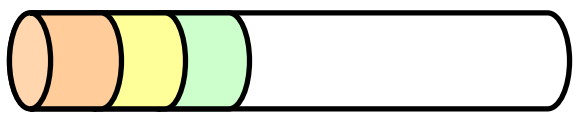
- Protein als langestreckter biegsamer Stab
- Masse proportional zur Länge
- Ladung proportional zur Länge (auf chemischem Weg)

->

- Reibungskraft proportional zur Länge (laminare Reibung prop. Fläche)
- Elektrische Kraft proportional zur Länge

->

Beweglichkeit unabhängig von Länge also auch von Masse



$$F_e = F_{fr} \qquad F_e \propto L \cdot q_0 \cdot E \qquad F_{fr} \propto L \cdot r^2 \cdot \eta$$

Resultierende Beweglichkeit $\mu \propto m^0$

Bewegungskräfte durch Wechselwirkung mit Ionen

Die Proteine bewegen sich in einer Träger-Flüssigkeit,
zusammen mit anderen teil-dissoziierenten Molekülen,
die über Ladung und Reibung gegenseitig wechselwirken.

Leitfähigkeit eines Elektrolyten

Die gesamte Leitfähigkeit eines Elektrolyten setzt sich aus der Leitfähigkeit durch Anionen und Kationen zusammen.

Spezifische Leitfähigkeit $\sigma = \sigma^- + \sigma^+$

Spezifische Leitfähigkeit $\sigma = F \cdot \alpha \cdot \left(\mu^- c^- z^- + \mu^+ c^+ z^+\right)$

Konzentration der Ionen (Molarität) c Einheit $\frac{mol}{l}$

Faraday Konstante F Einheit $\frac{As}{mol}$

Dissoziationskonstante α

Leitfähigkeit eines Elektrolyten

Grundsätzliche Idee der Leitfähigkeit:

- Jedes in die Lösung eingebrachte Molekül dissoziiert
- Jedes der Anionen und Kationen trägt mit seiner konstanten Beweglichkeit zur Leitfähigkeit bei.

Realität:

- Nicht jedes Molekül dissoziiert
- Die Beweglichkeit hängt von den anderen Ionen ab

=>

Modelle für die Leitfähigkeit unter unterschiedlichen Bedingungen

Reaktionsgleichgewicht

Reaktionsgleichung schwache Säure HA
(z.B. HCl, gilt aber auch für Elektrolyt NaCl)

$$HA + H_2O \leftrightarrow A^- + H_3O^+$$

Reaktionsgleichgewicht allgemein

$$K = \frac{V_{Hinreaktion}}{V_{Rückreaktion}}$$

Reaktionsgeschwindigkeit

v ~ Konzentration der Ausgangsprodukte

chemische Schreibweise für Konzentration $[X]$

Dissoziationsgleichgewicht

$$K = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA][H_2O]}$$

Das Ostwaldsche Verdünnungsgesetz

Definition Dissoziationsgrad $\alpha = \frac{[A^-]}{c}$

Ausgangskonzentration der Säure c

Dissoziationsgleichgewicht $K = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA][H_2O]} = \frac{\alpha^2 c}{1-\alpha}$

$[A^-] = \alpha c$ $[H_3O^+] = \alpha c$ $[HA] = (1-\alpha)c$ $[H_2O] = 1$

Allgemein $\alpha = \frac{K_c}{2c} \cdot \left\{ \left(1 + \frac{4c}{K_c} \right)^{1/2} - 1 \right\}$

für kleine Dissoziationsgrade $\alpha << 1$

Ostwaldsches Verdünnungsgesetz $\alpha = \sqrt{\frac{K_c}{c}}$

Resultierende reale Leitfähigkeiten von Elektrolyten

Spezifische Leitfähigkeit

$$\sigma = F \cdot \alpha \cdot \left(\mu^- c^- z^- + \mu^+ c^+ z^+ \right)$$

Schwache Elektrolyte, verdünnt

Ostwaldsches Verdünnungsgesetz

$$\alpha = \sqrt{\frac{K_c}{c}}$$

Konzentrationsabhängige Leitfähigkeit Schwacher verdünnter Elektrolyte

$$\sigma \propto \left(\mu^- + \mu^+ \right) \cdot \sqrt{c}$$

Starke Elektrolyte, verdünnt

$$\alpha = 1$$

Konzentrationsabhängige Leitfähigkeit Starker verdünnter Elektrolyte

$$\sigma \propto \left(\mu^- + \mu^+ \right) \cdot c$$

Molare Leitfähigkeiten von Elektrolyten

Schwache verdünnte Elektrolyte $\sigma \propto \sqrt{c}$

Nicht alle Ionen sind dissoziert

Starke verdünnte Elektrolyte $\sigma \propto c$

Alle Ionen sind dissoziert

Molare Leitfähigkeit $\Lambda := \frac{\sigma}{c}$

Die Grenzleitfähigkeit:
Leitfähigkeit im Linit unendlicher Verdünnung

$$\Lambda_\infty := \lim_{c \to 0} \Lambda$$

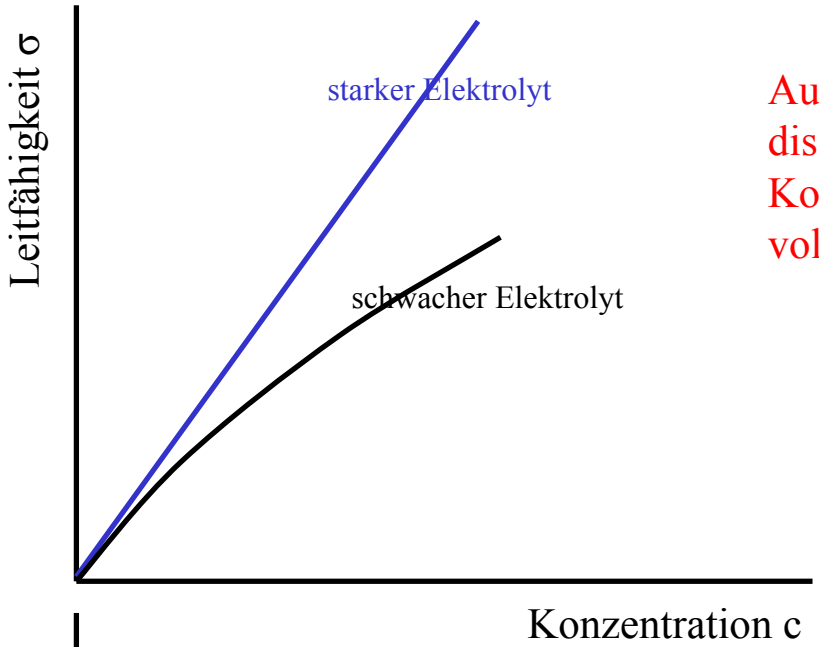
Starke verdünnte Elektrolyte $\Lambda = \Lambda_\infty$

Schwache verdünnte Elektrolyte $\Lambda = \Lambda_\infty \cdot \frac{1}{\sqrt{c}}$

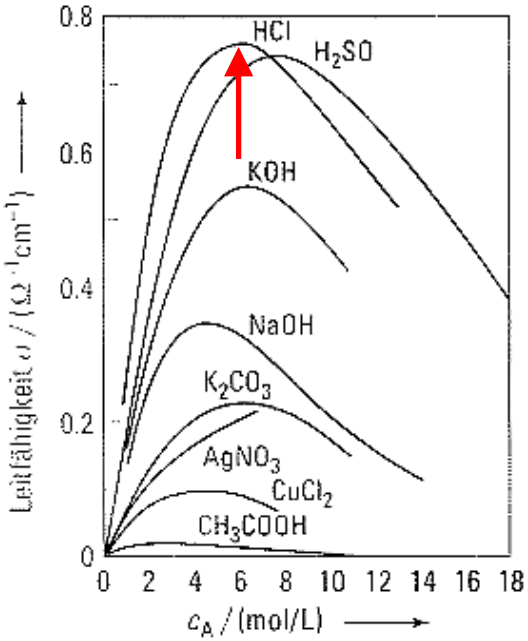
Schwache Elektrolyte

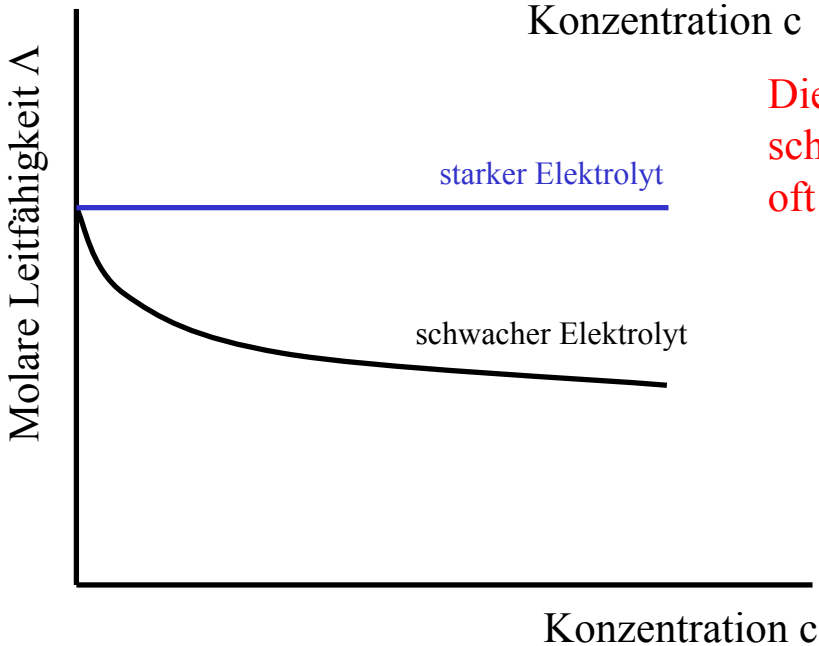
$$\Lambda = \Lambda_\infty \cdot \frac{K_c}{2c} \cdot \left\{ \left(1 + \frac{4c}{K_c} \right)^{1/2} - 1 \right\}$$

Reale Elektrolyte

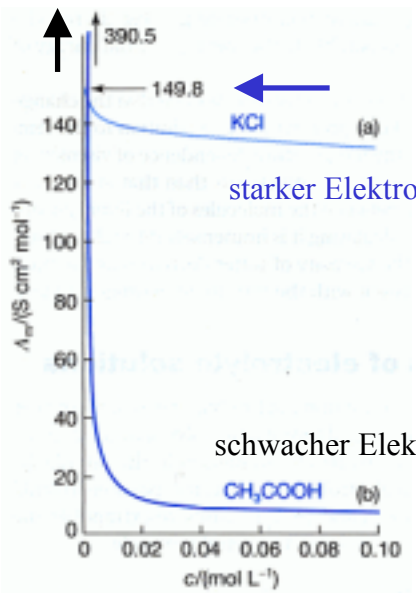


Auch starke Elektrolyte dissoziieren bei hohen Konzentrationen nicht vollständig





Die Grenzleitfähigkeit schwacher Elektrolyte ist oft größer als die starker



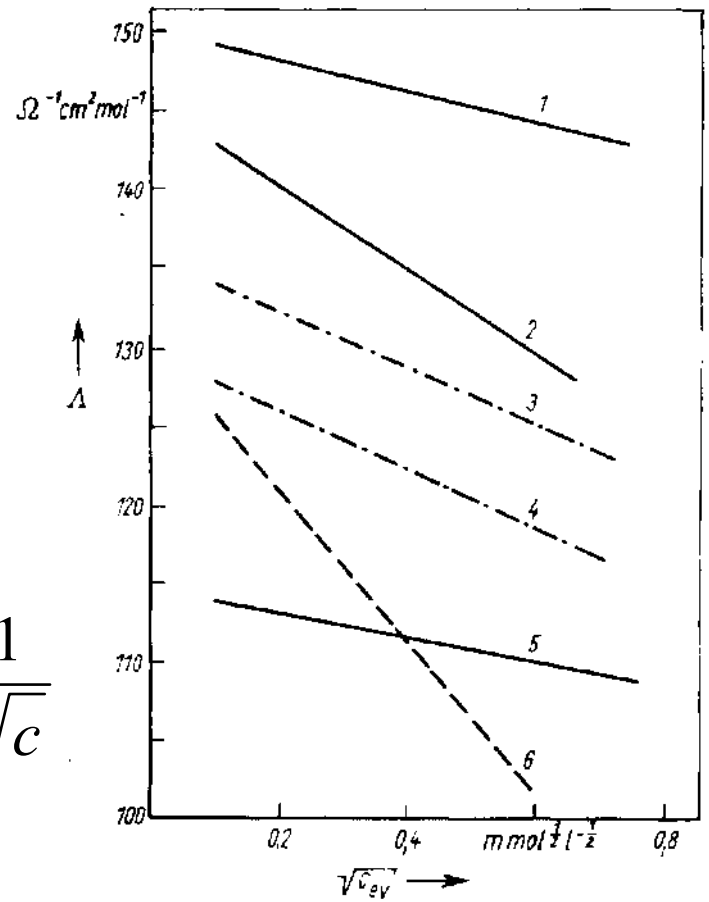
Kohlrausch's Gesetz

Molare Leitfähigkeit
Starker verdünnter Elektrolyte

$$\Lambda = \Lambda_\infty$$

Kohlrausch's Gesetz
(empirisch)
Molare Leitfähigkeit
Starker Elektrolyte

$$\Lambda = \Lambda_\infty - K\frac{1}{\sqrt{c}}$$



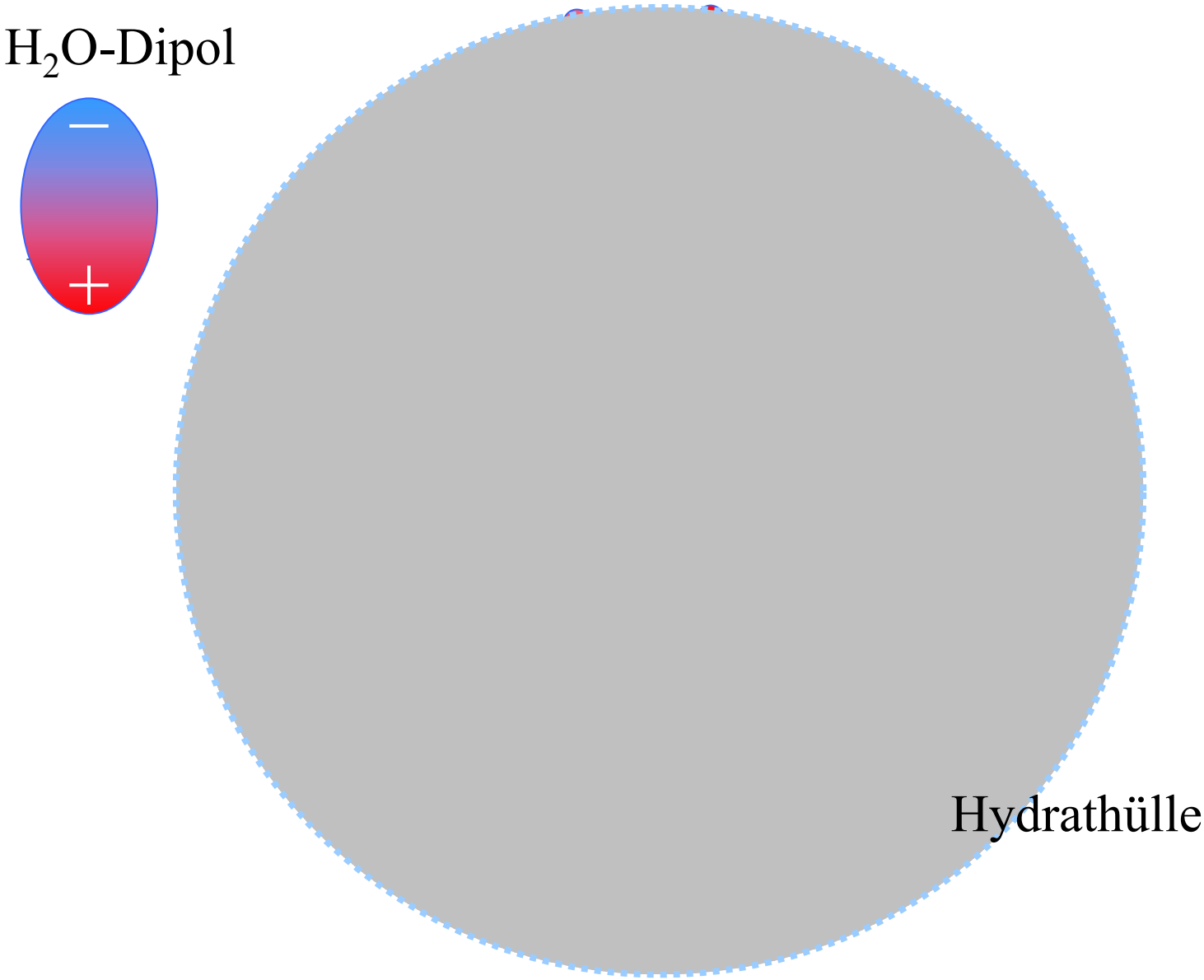
1	KCl	2	$LaCl_3$
3	$CaCl_2$	4	Na_2SO_4
5	LiCl	6	$MgSO_4$

Das Debye-Hückel-Modell

Bestätigung des Kohlrausch-Gesetzes durch das
Debye-Hückel-Onsager-Modell

Erklärung der verbleibenden Konzentrationsabhängigkeit
aus Hydrathülle

Hydrathülle, Solvatisierung



Bewegungskräfte im Debye-Hückel-Modell

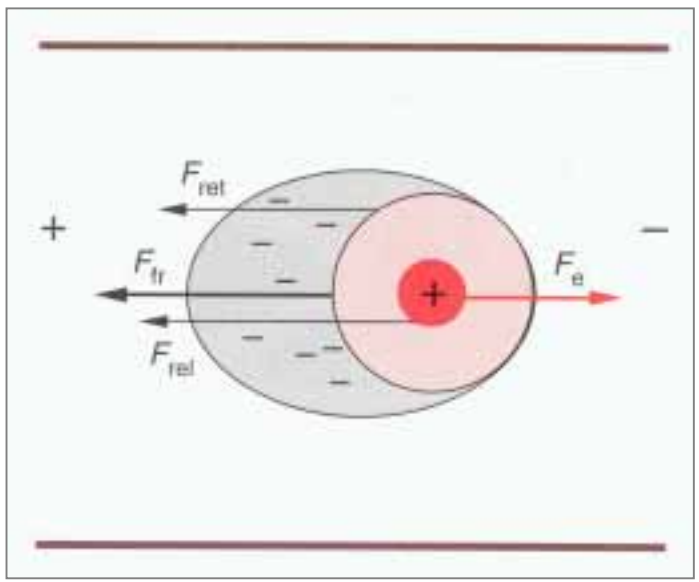
Konsequenzen der Hydrathülle:

- Das Debye-Hückel-Onsager-Modell bestätigt Kohlrausch's Gesetz

Molare Leitfähigkeit

$$\Lambda = \Lambda_\infty - K\frac{1}{\sqrt{c}}$$

- Der effektive Teilchenradius ist erheblich größer als das einfache Ion
- Bei Bewegung entstehen Relaxationskräfte aufgrund der Verformung der Hydrathülle



Retardations-Kraft F_{ret}

Relaxations-Kraft F_{rel}

Visualisierung der Reibungskräfte auf Ionen im freien Elektrolyten

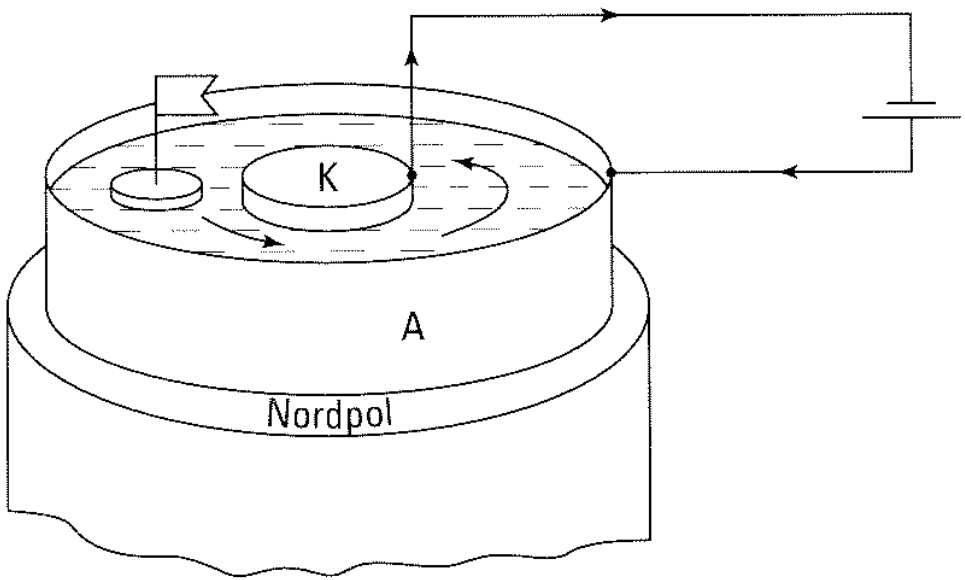


Abb. 12.7 Nachweis der Reibung zwischen Ionen und Flüssigkeit. A = Anode, K = Kathode. Der Versuch ist eine Abwandlung des Barlowschen Rades.

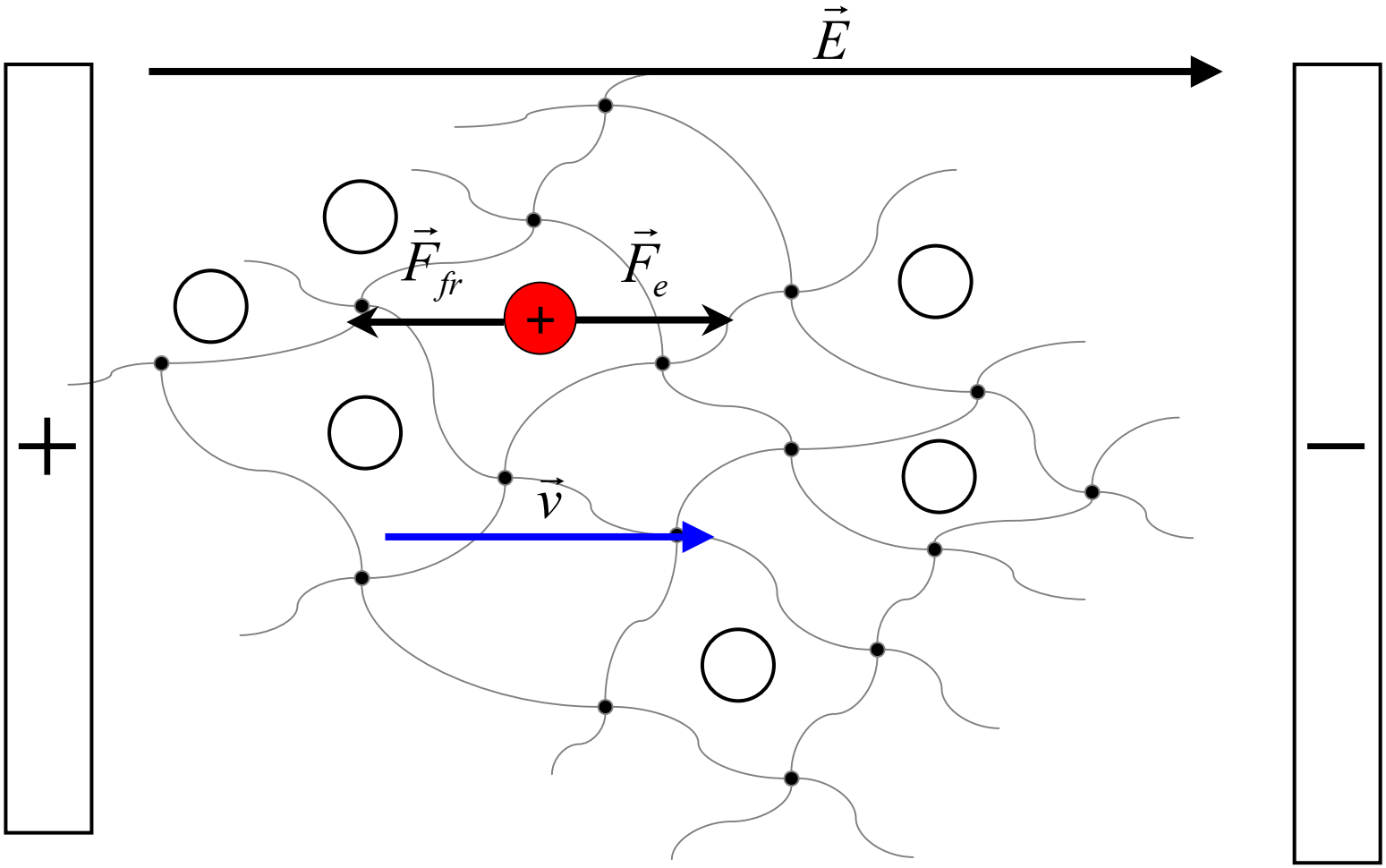
Reibungskraft $\Leftrightarrow$ Lorentz-Kraft $F = q \cdot \left(\vec{v} \times \vec{B}\right)$

Bewegungskräfte in / durch Trennmatrix

Bisher alle Überlegungen im freien Elektrolyten

Bei der Elektrophorese bewegen sich die Proteine in einer porösen Matrix die mit Elekrolyt 'gefüllt' ist

Bewegungskräfte auf ein Ion in einer Trennmatrix



Bewegungskräfte auf ein langestrecktes Ion in einer Trennmatrix

Unterschiedliche Regime die von der Masse des Ions (Proteins) abhängen

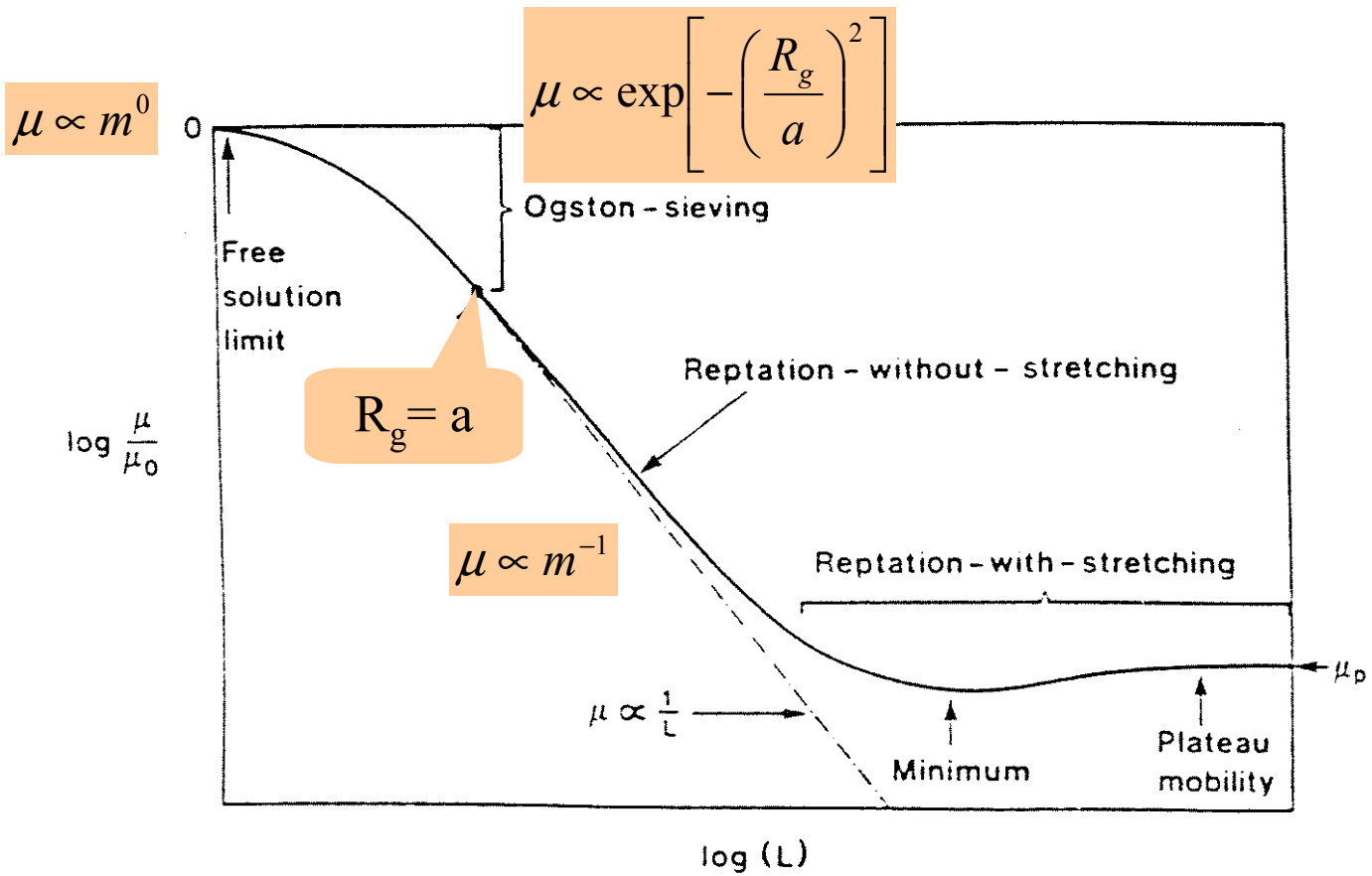
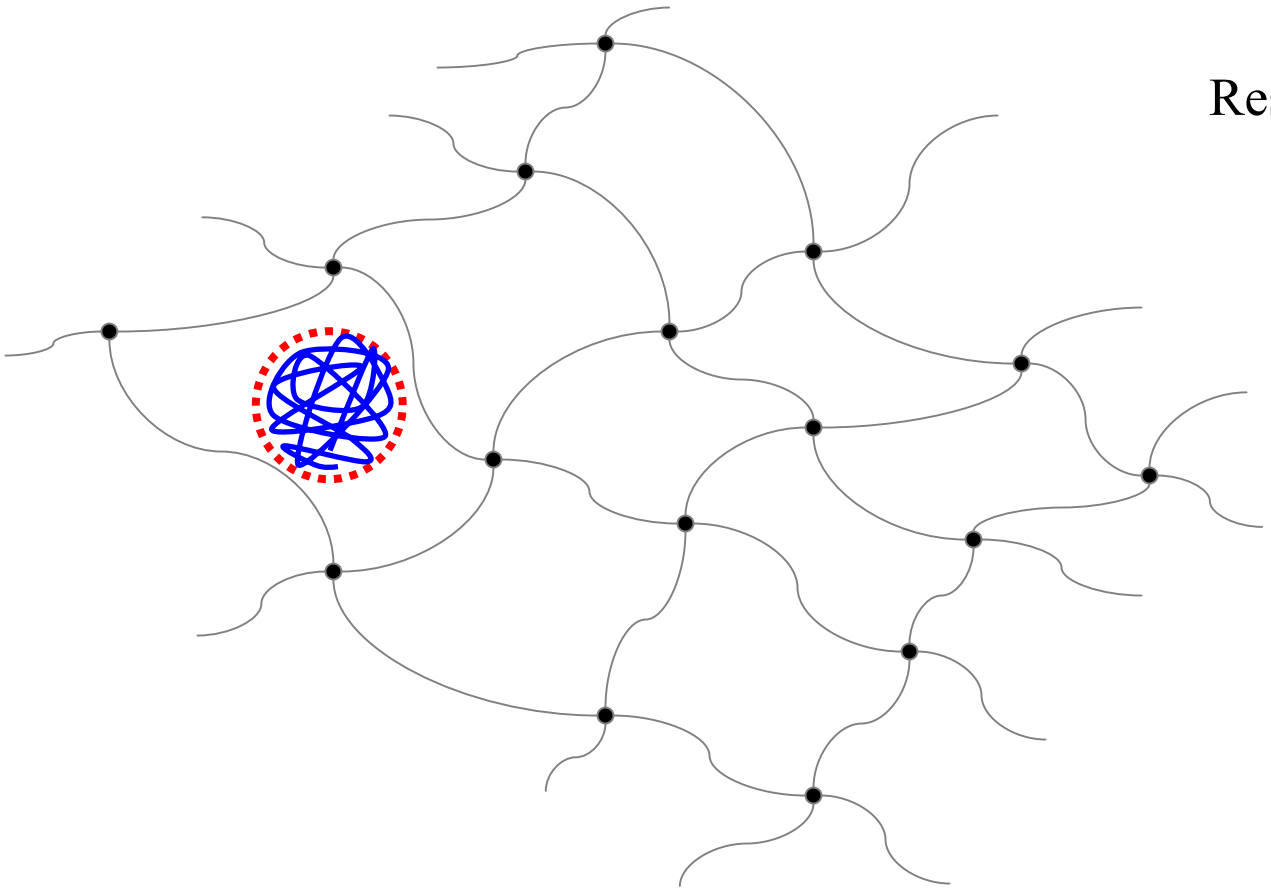


Figure 2. A schematic log-log plot of reduced mobility, μ/μ_0, *vs.* molecular size L. The various regimes are discussed in Section 2. From [23], with permission.

Das Ogston Modell

Das Ogston Modell, Bewegung kleiner Ionen in einer Matrix

- Ion als harte Kugel
- Bewegung in Hohlräumen die die Kugel unterschiedlich weit ausfüllt



Resultierende Beweglichkeit:

$$\mu \propto \exp\left[-\left(\frac{R}{a}\right)^2\right]$$

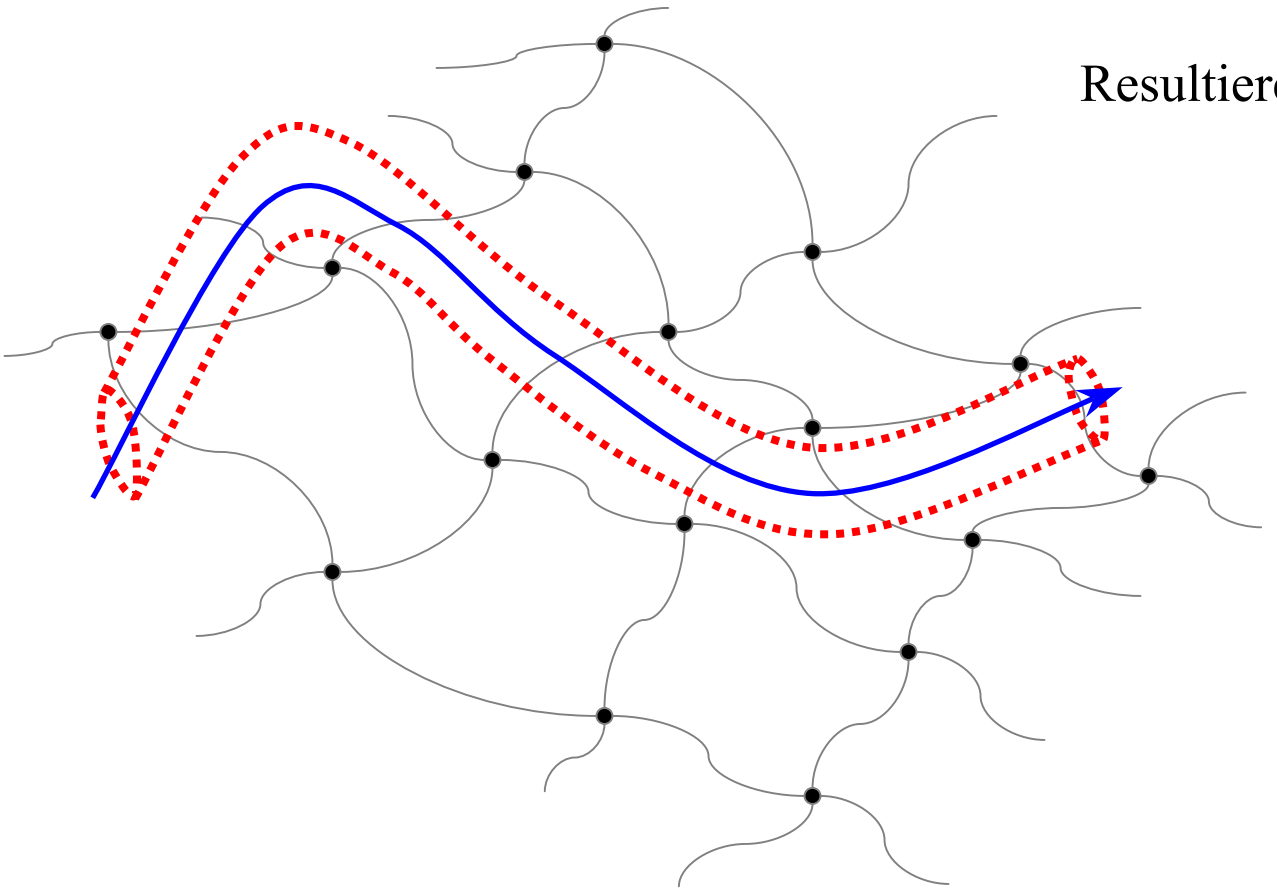
Radius R

Maschenweite a

Das Reptation Modell

Das Reptation Modell, Bewegung mittlerer und großer Ionen in einer Matrix

- Ion als Knäul das sich durch Höhlräume schlängelt und dabei teilweise entwirrt
- Bewegung in Röhre



Resultierende Beweglichkeit:

$$\mu \propto m^{-1}$$

Ionen unterschiedlicher Massen im Reptation-Modell

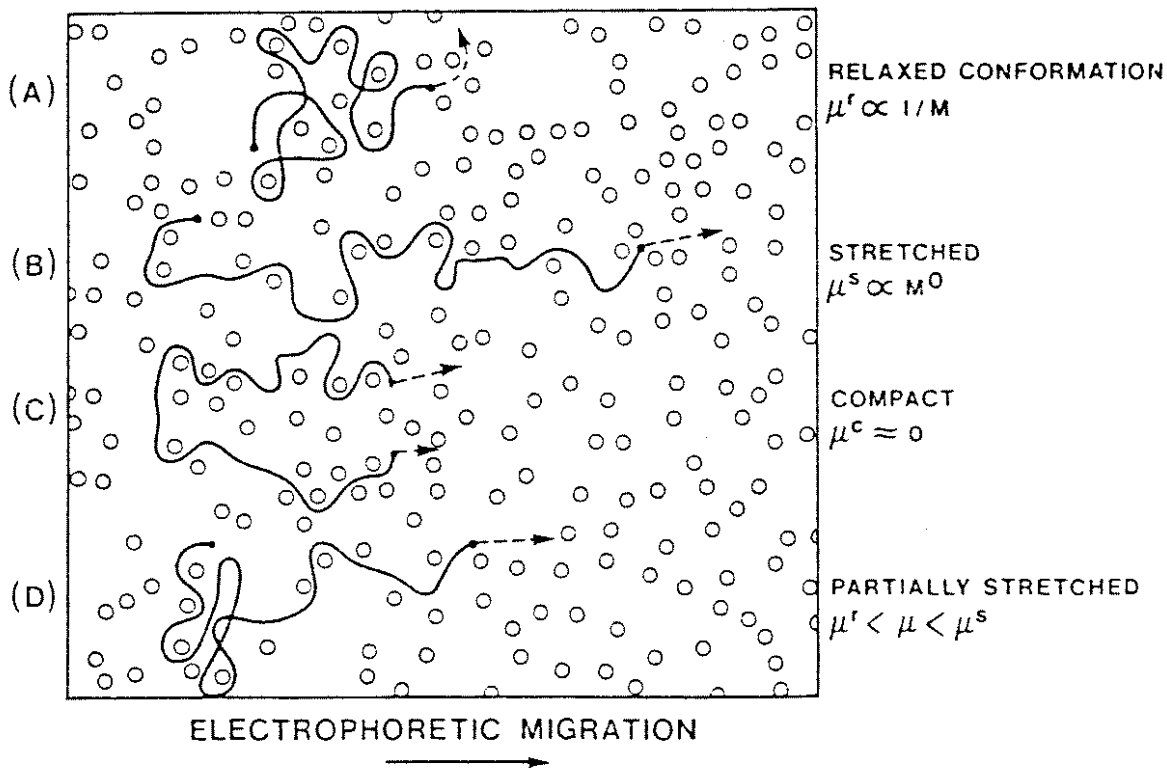
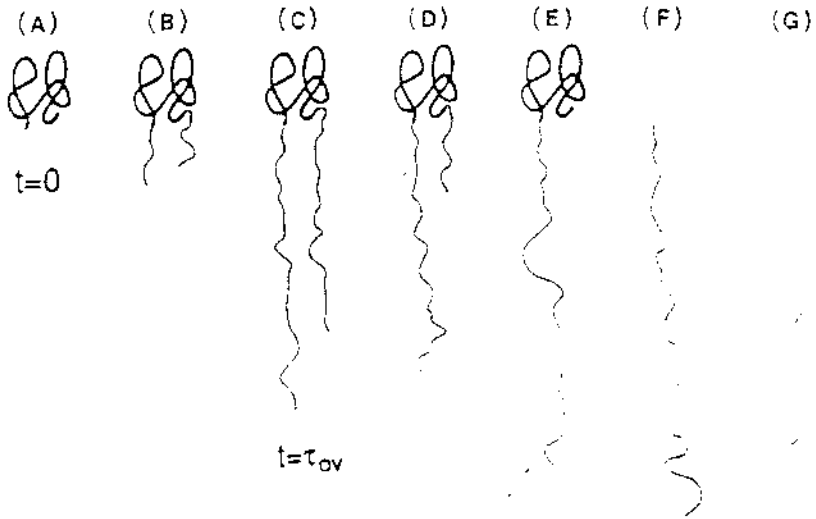


Figure 18. Conformations of migrating molecules when relaxed (top panel), stretched (middle panel), or compact (bottom panel). Compact conformations have an end-to-end vector whose projection in the field direction vanishes, with the result that the electrical force on either arm is approximately the same, and the net force on the molecule vanishes. The molecule remains in the compact conformation until the Brownian motion pushes one end of the molecule ahead of the other. From [33], with permission.

Modell - Tatsächliche Reptation



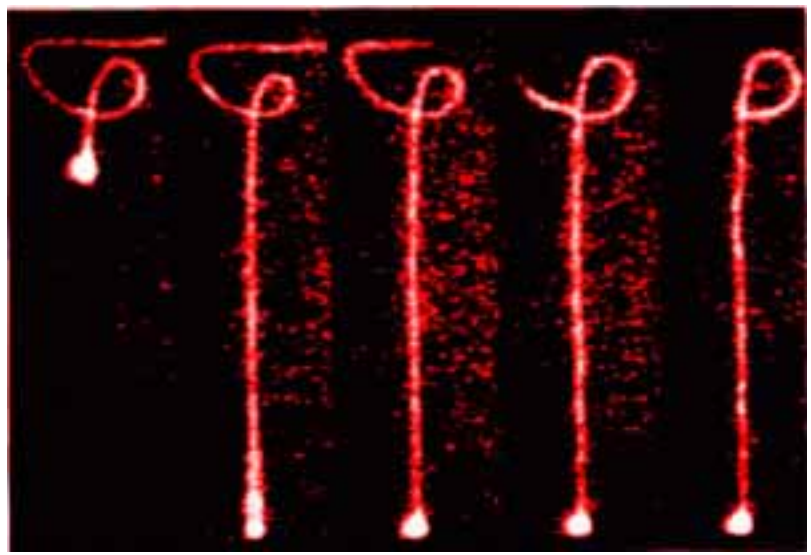
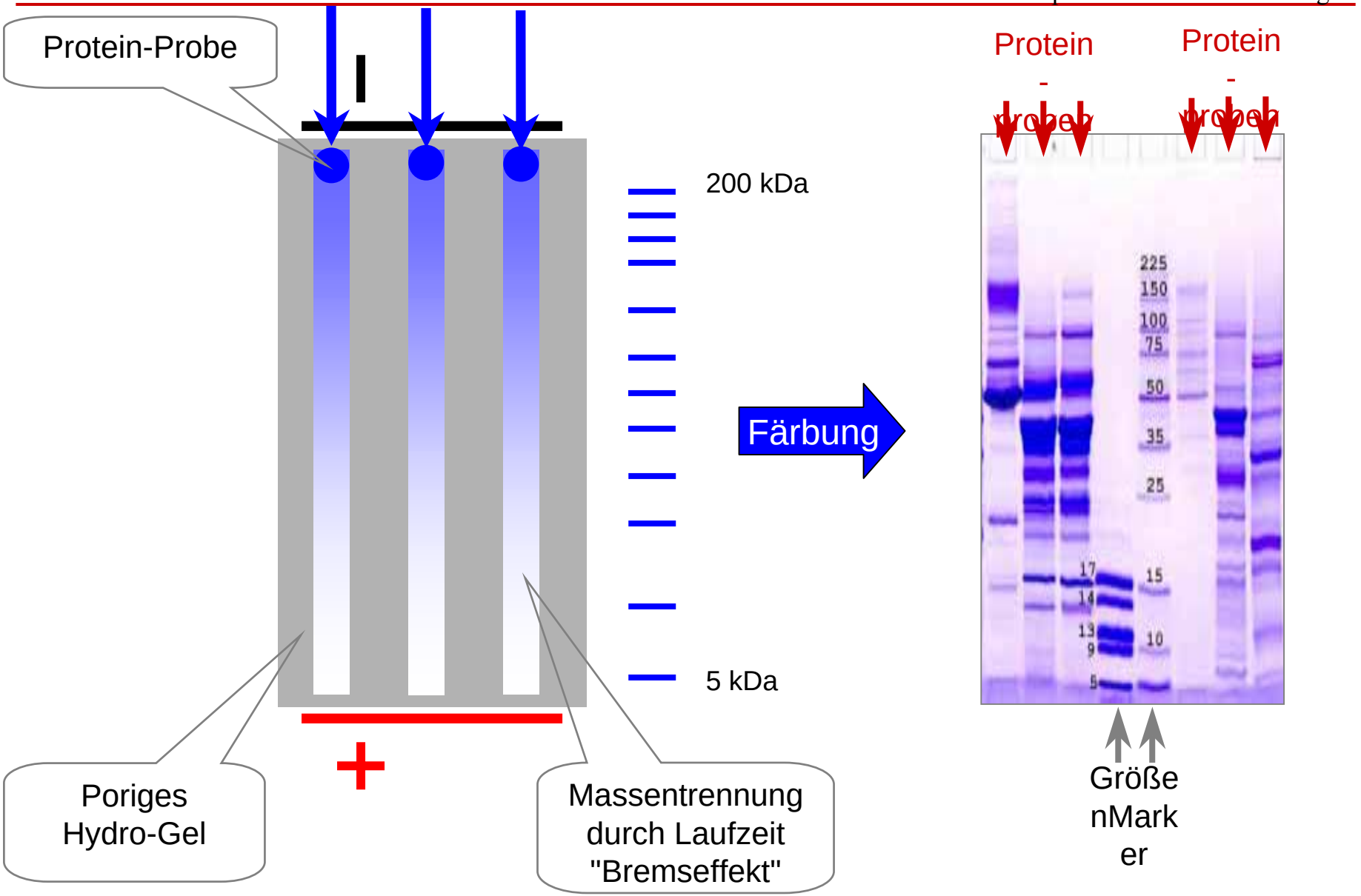


Figure 9. Schematic picture of the downward motion of a DNA molecule in a gel in response to an electric field suddenly applied at $t = 0$. The conformational changes involve the stretching of the two arms (B–C), the eventual dominance of one arm (D–C), disengagement from the original set of obstacles (F), followed by chain relaxation (G). Adapted from [29], with permission.

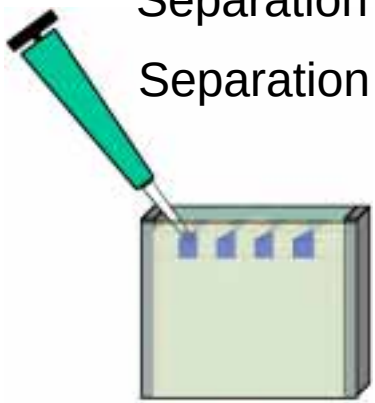
Auftrennung von Proteinen mittels Elektrophorese

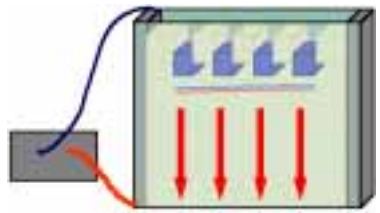


Manuelle Elektrophorese

Separation by **Molecular Weight**

Separation time: **1 - 2 h**

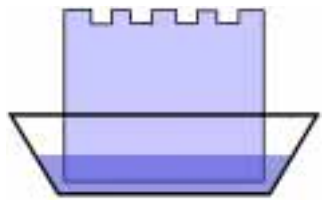


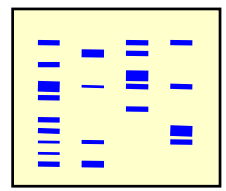


Detection by Staining

SDS-PAGE, 14 Steps

Total time: **2 - 4 h**

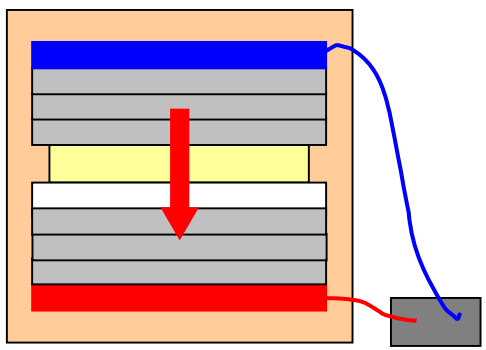


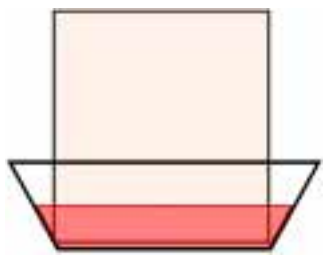


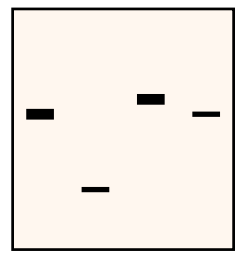
Detection via Antibodies

WesternBlot, 27 Steps

Total time: **8 -12 h**

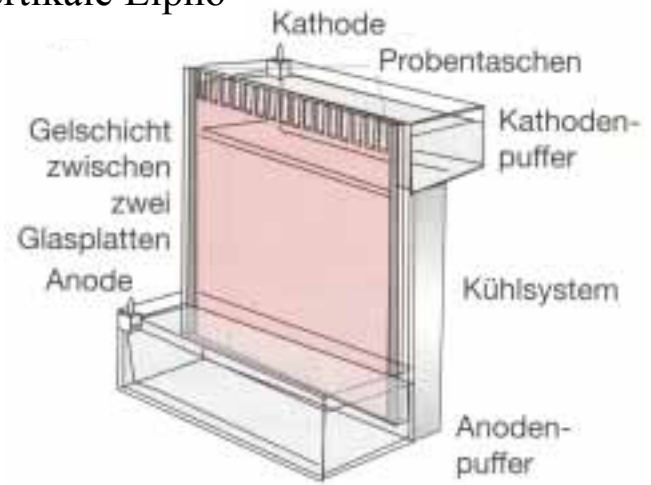




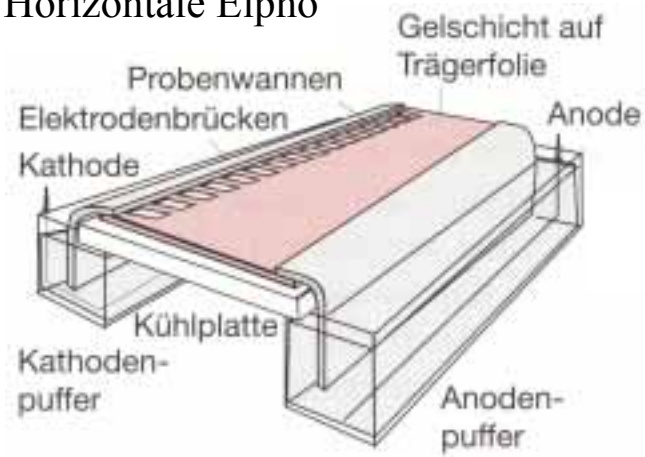


Typische Apparaturen der Gel-Elektrophorese

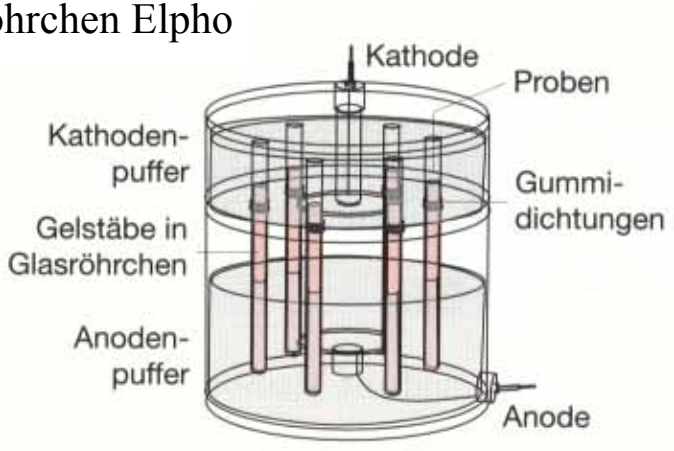
Vertikale Elpho



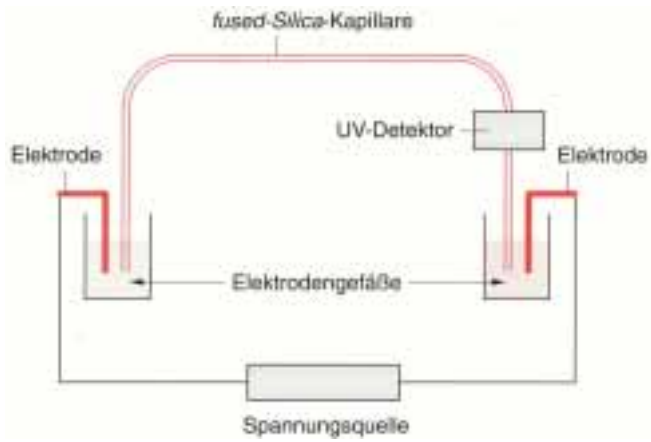
Horizontale Elpho



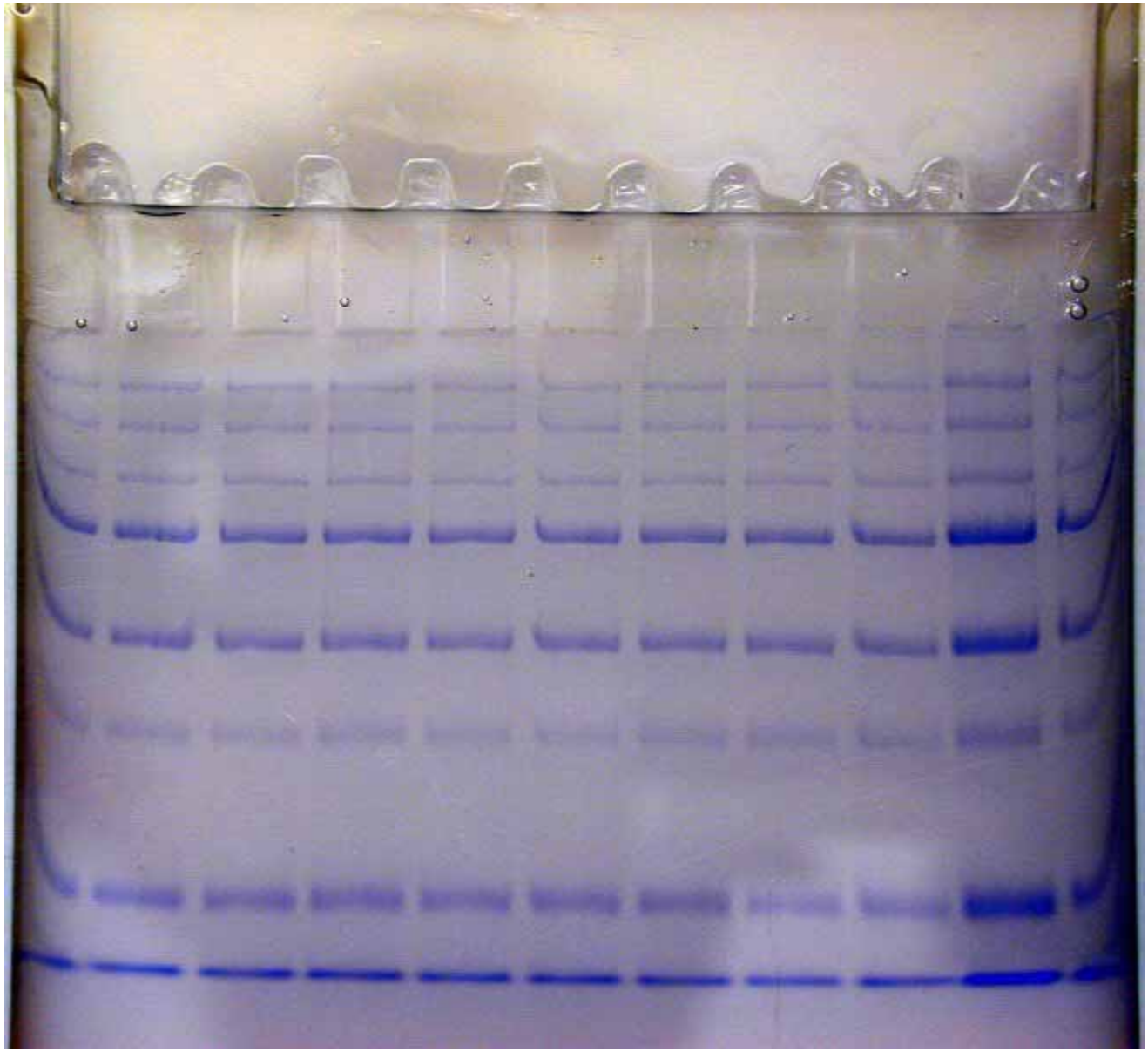
Röhrchen Elpho



Kapillar Elpho



Typischer Elpho-Run in Vertikaler Kammer



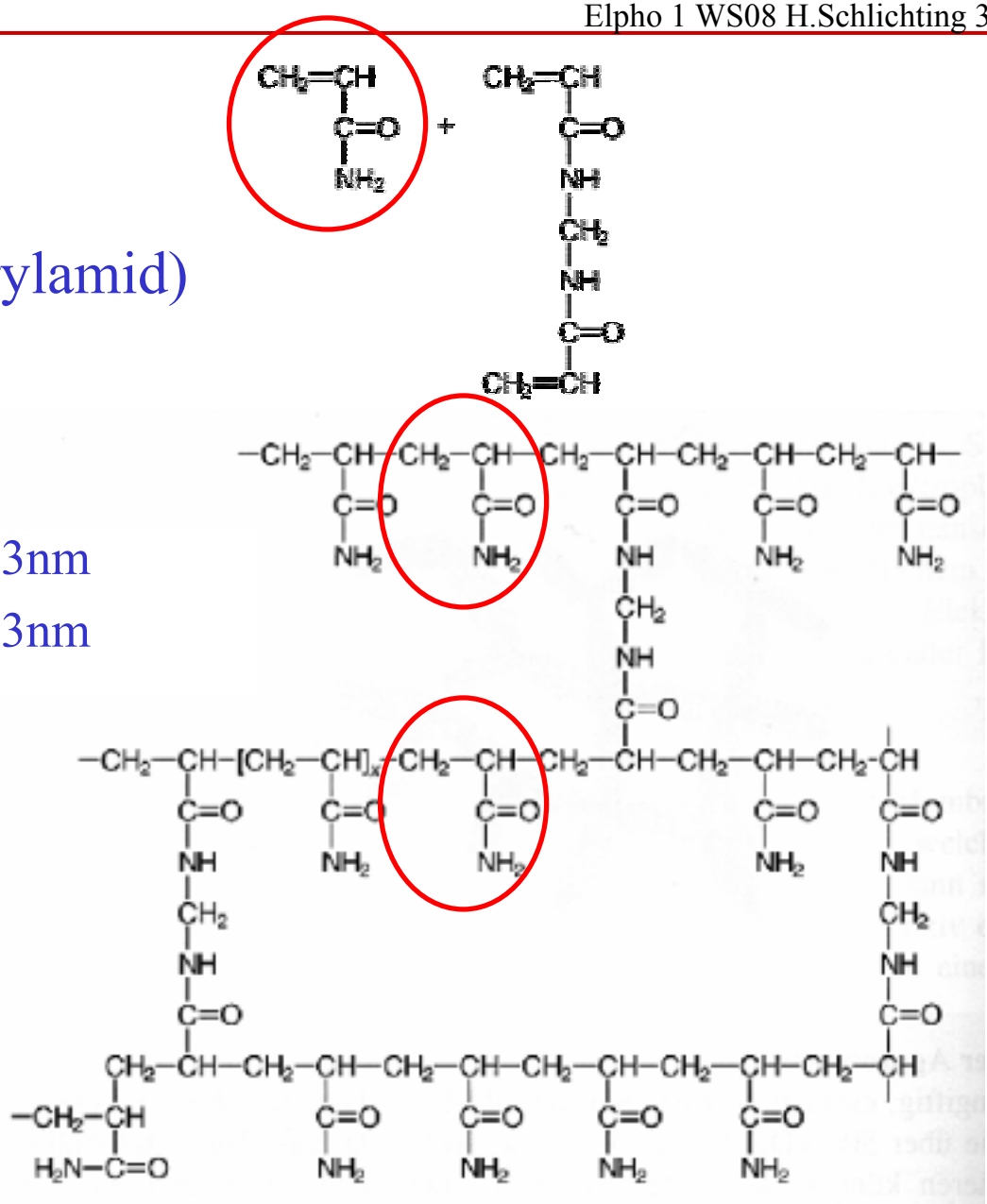
Hydrogel als Trennmatrix: Polyacrylamid

90 % Wasser

10 % (Acrylamid + Bis-Acrylamid)

5%-Gel Porengröße 5,3nm

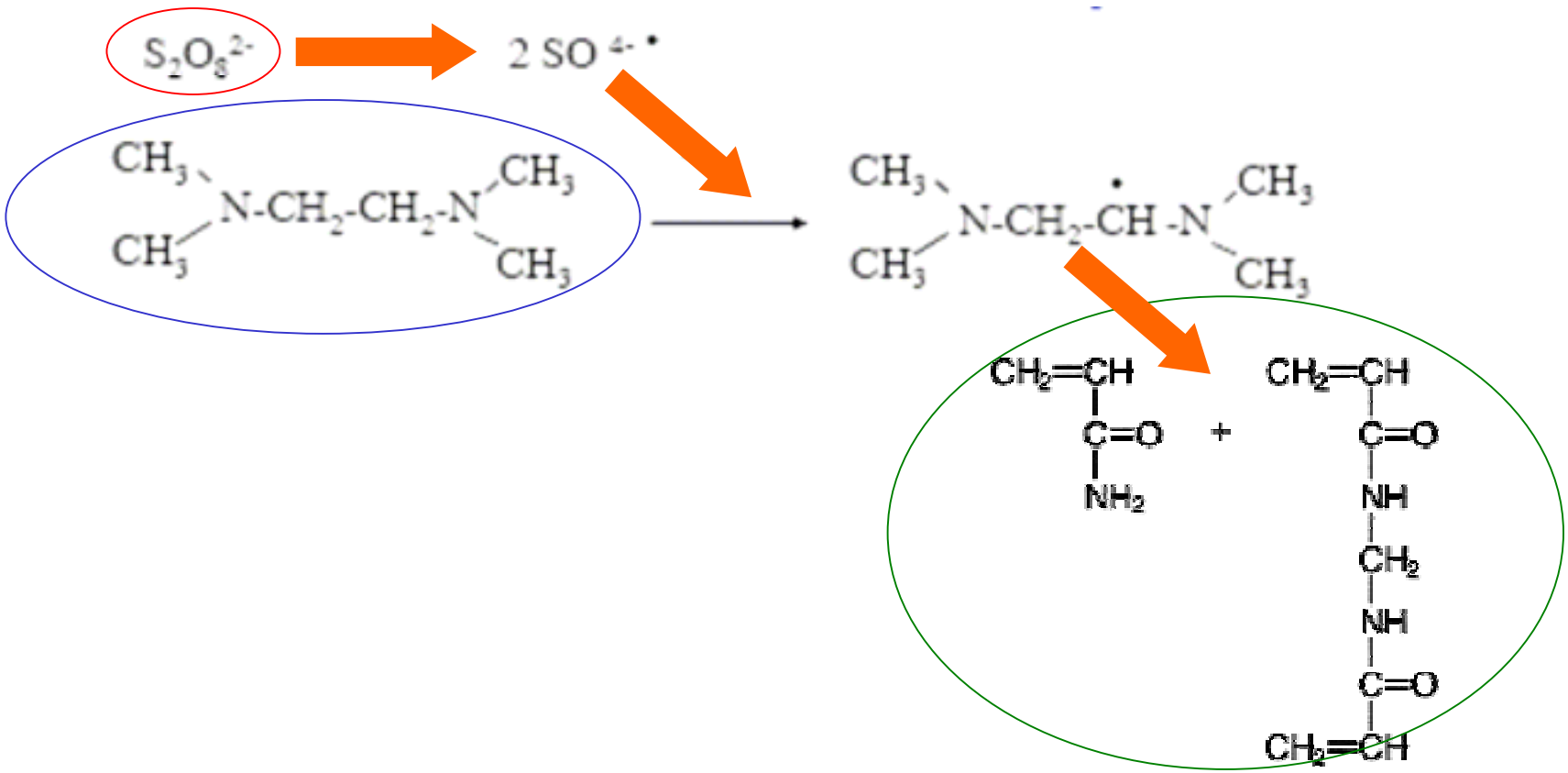
20%-Gel Porengröße 3,3nm



Bildung des Netzwerks durch radikalische Reaktion

Chemische Polymerisation

- Reaktionsstart durch thermische Radikalbildung aus Ammoniumperoxodisulfat $(NH_4)_2S_2O_8$ (Initiator)
- Übertragung der Radikale auf TEMED (Katalysator) und von dort auf Acrylamid-Momomere → Bildung von Polymerketten + Querverknüpfungen

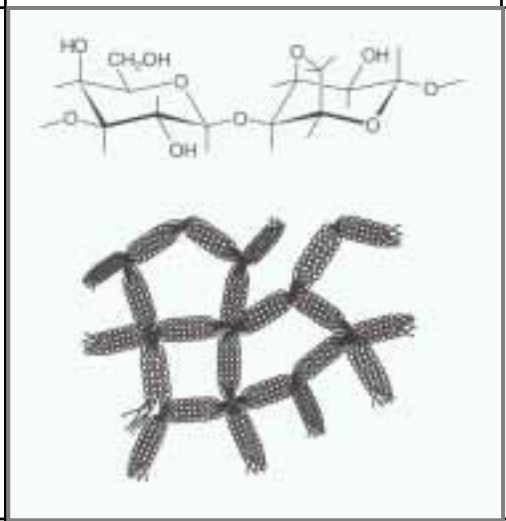


Bildung des Netzwerks durch radikalische Reaktion

Photo-Polymerisation

- UV-Bestrahlung eines photosensitiven Initiators (UVA-UVC)
- Radikalbildung durch:
  - Spaltung des Initiators in 2 radikalische Moleküle (Benzoin-Derivate)
  - H-Abstraktion (Quinone, Benzophenone)
  - charge transfer (Riboflavin) → Rib $^{\bullet}$ + TEMED $^{\bullet}$ → Acrylamid $^{\bullet}$ → PAA
- Übertragung der Radikale auf Acrylamid → Polymerisation

Geltypen als Trennmatrix

	Agarose	PolyAcrylamid	Composite
Bestand-teile	Polysaccharid (aus Rotalgen)	Acrylamid/Bisacrylamid	Acrylamid/Bisacrylamid + Agarose
Porengröße	150nm - 500nm (Konz:1% - 0.2%)	3 - 6 nm einstellbar T= (a+b)*100/V C=b*100/(a+b)	
Struktur		Netzwerk aus crosslinked Polymeren (AA : BA = 19 bis 40 : 1)	2 Doppel-Helices lateral, verknüpft an den Enden Zwischenräume gefüllt mit crosslinked Polymeren
Anwendung	für Moleküle >10nm ø **DNA,** Proteine>500kDa	**Proteine**, Peptide, DNA	

Verhalten ungeladener Teilchen in Flüssigkeit: Diffusion

1. Fick'sches Gesetz $j = -D \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x}$ $\frac{1}{m^2 s}$

Diffusionskonstante D $\frac{m^2}{s}$

		Diffusions-Länge 1mm
H^+ in Wasser	9,3 10^{-9} $m^2 s^{-1}$	30 s
Dextrose in Wasser	1,3 10^{-9} $m^2 s^{-1}$	3 min
Protein in Wasser	0,02 10^{-9} $m^2 s^{-1}$	5 h

Diffusion durch Membran $j = -P \cdot \Delta c$

Permeabilität P $\frac{m}{s}$

Diffusion

Zusammenhang zwischen Diffusionskonstante und Beweglichkeit eines Ions

Einstein Relation $$D = \mu \cdot \frac{RT}{zF}$$

Hergeleitet für:

- Ion ist eine Kugel mit Radius r
- Kräfte durch Reibung in der Flüssigkeit mit Viskosität η

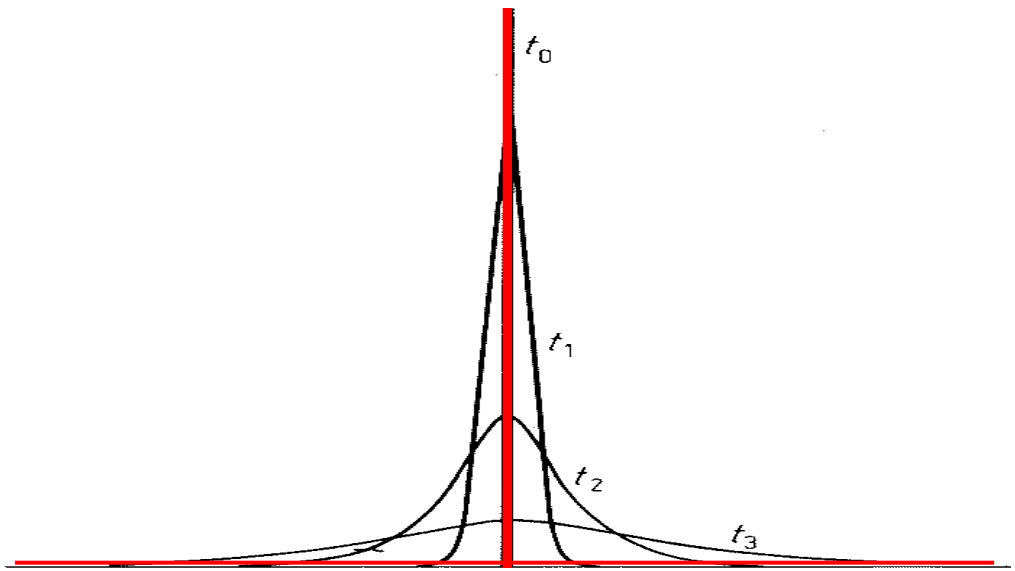
Stokes-Einstein Relation $$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

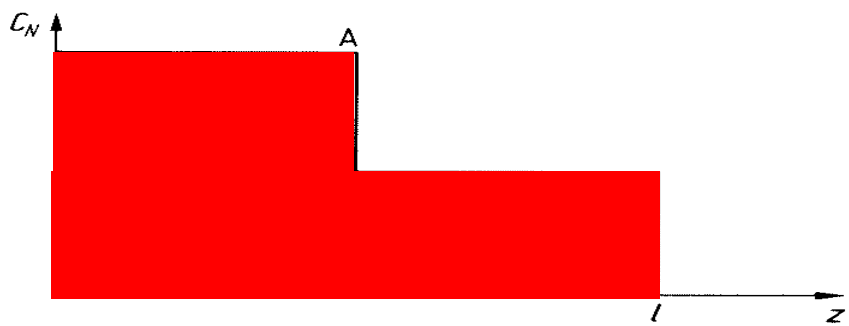
2. Fick'sches Gesetz $$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial z^2}$$

Beispiele Diffusion

$$C_N(z,t) = \frac{c_N^0}{\sqrt{\pi \cdot D \cdot t}} e^{-\frac{z^2}{4Dt}}$$

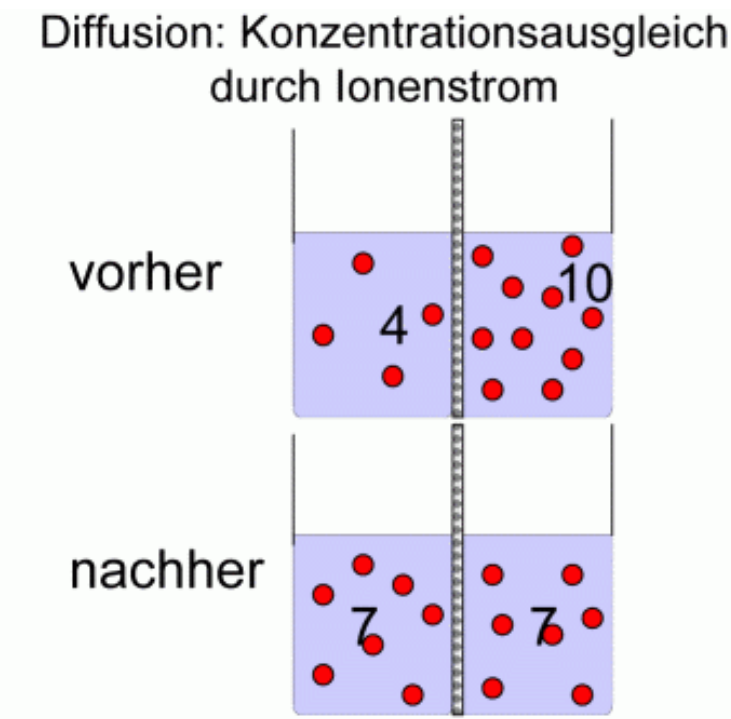
$$C_N(z,t) = \frac{C_N^0}{2}\left[1 - \Phi\left(\frac{z}{2\sqrt{D \cdot t}}\right)\right]$$



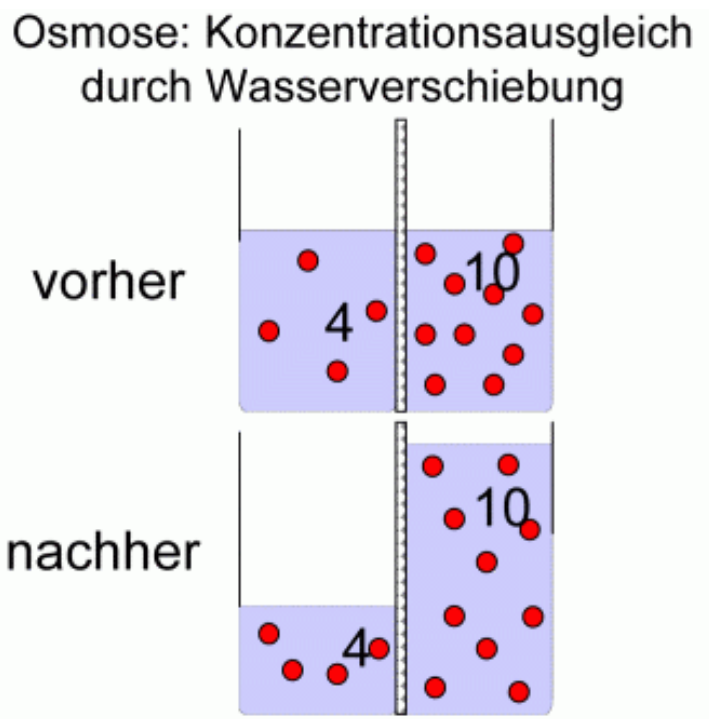


Diffusion ⇔ Osmose

Was ist Unterschied zwischen Diffusion und Osmose ?

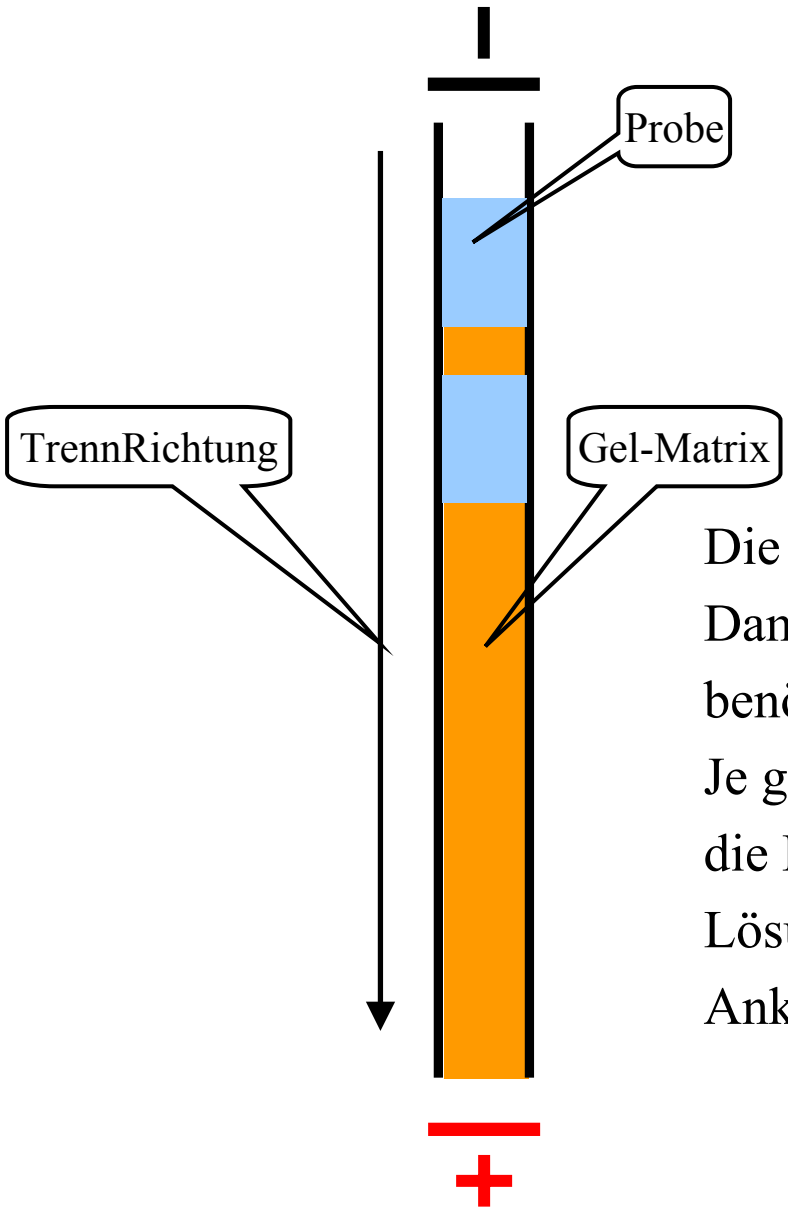


Diffusion kostet keine Energie, da sie dem Konzentrationsgefälle folgt



Bei der Wasserverschiebung wird die Volumenarbeit pV =mgh geleistet

Schwierigkeiten: Bandenverbreiterung - Sensitivität



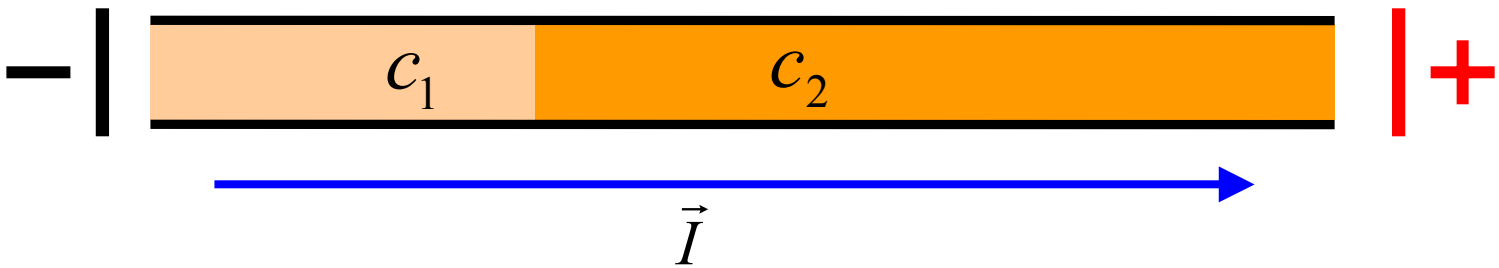
typisches Volumen 5 µl = 5 mm^3

Die Konzentration der Proben ist vorgegeben.
Damit man eine ausreichende Sensitivität erzielt, benötigt man eine bestimmte Stoffmenge.
Je geringer die Konzentration desto breiter wird die Probe im Gel 'verschmiert'.
Lösung:
Ankonzentrierung der Probe durch **StackerGel**

Ionen im freien Elektrolyten: unterschiedliche Konzentrationen

Konzentration c_i

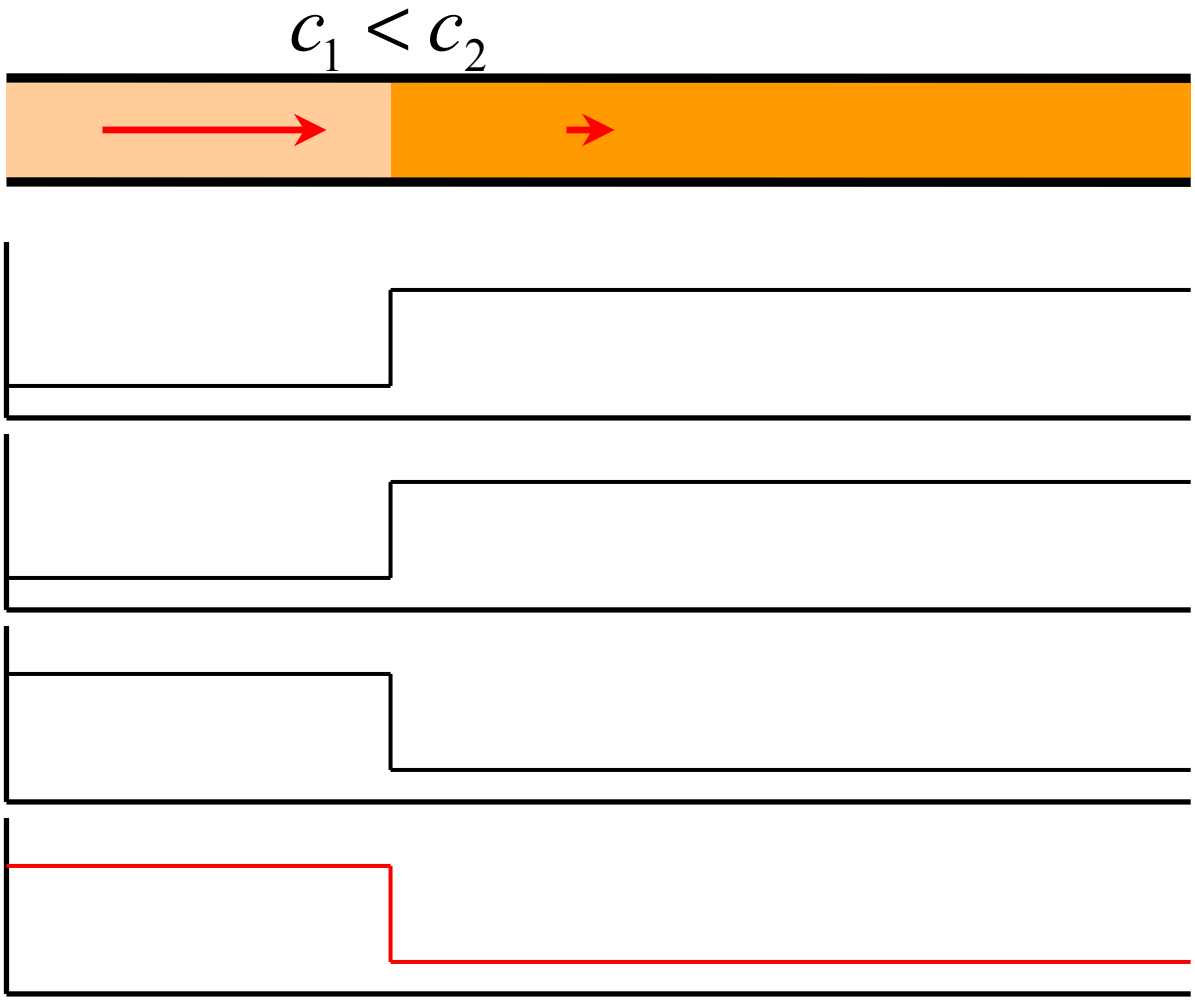
Leitfähigkeit $\sigma_i \sim c_i$



Feldstärke $E_i \sim \frac{1}{\sigma_i}$ da nur 1 Strompfad

Geschwindigkeit $v_i \sim \frac{\mu}{c_i}$ da $v = \mu \cdot E$

Ionen im freien Elektrolyten: Konzentrations-Grenze



Ionen im freien Elektrolyten: Wandernde Konzentrations-Grenze

An einem Konzentrations-Anstieg des Elektrolyten 'stauen' sich die Ionen.

$c_1 < c_2$

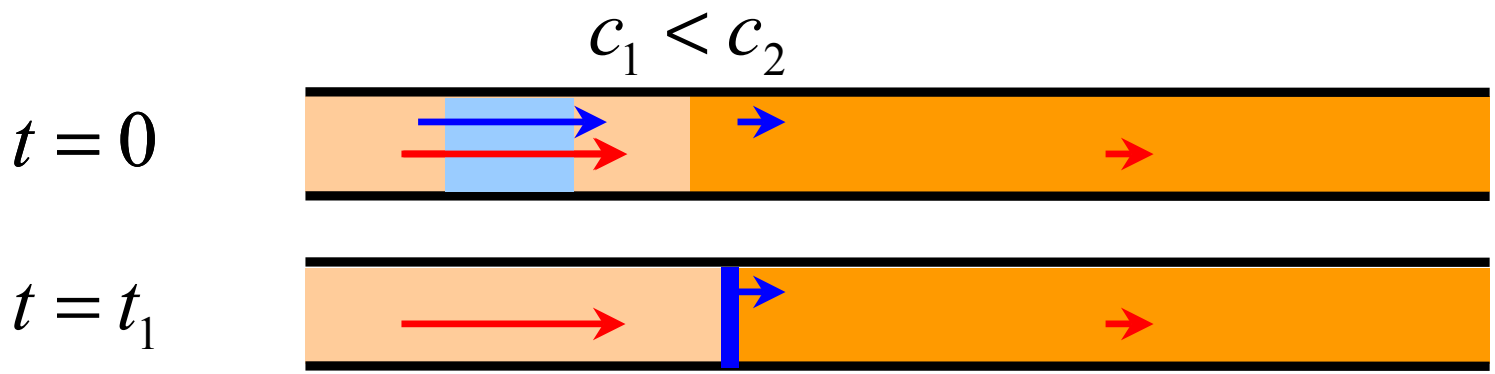
$t = 0$

$t = t_1$

$$\frac{v_1}{v_2} = \frac{c_2}{c_1}$$

Probe im freien Träger-Elektrolyten: Stacking

Verwendung eines Konzentrations-Anstieg des Träger-Elektrolyten um die Probe anzukonzentrieren.



Wenn $\mu_{Probe} < \mu_{Träger}$

$$\frac{v_1}{v_2} = \frac{c_2}{c_1}$$