Elektrophorese von Proteinen II

H.Schlichting

Zusammenfassung Molare Leitfähigkeit eines Elektrolyten

Molare Leitfähigkeit (pro Teilchen)

$$\Lambda = \frac{\sigma}{c}$$

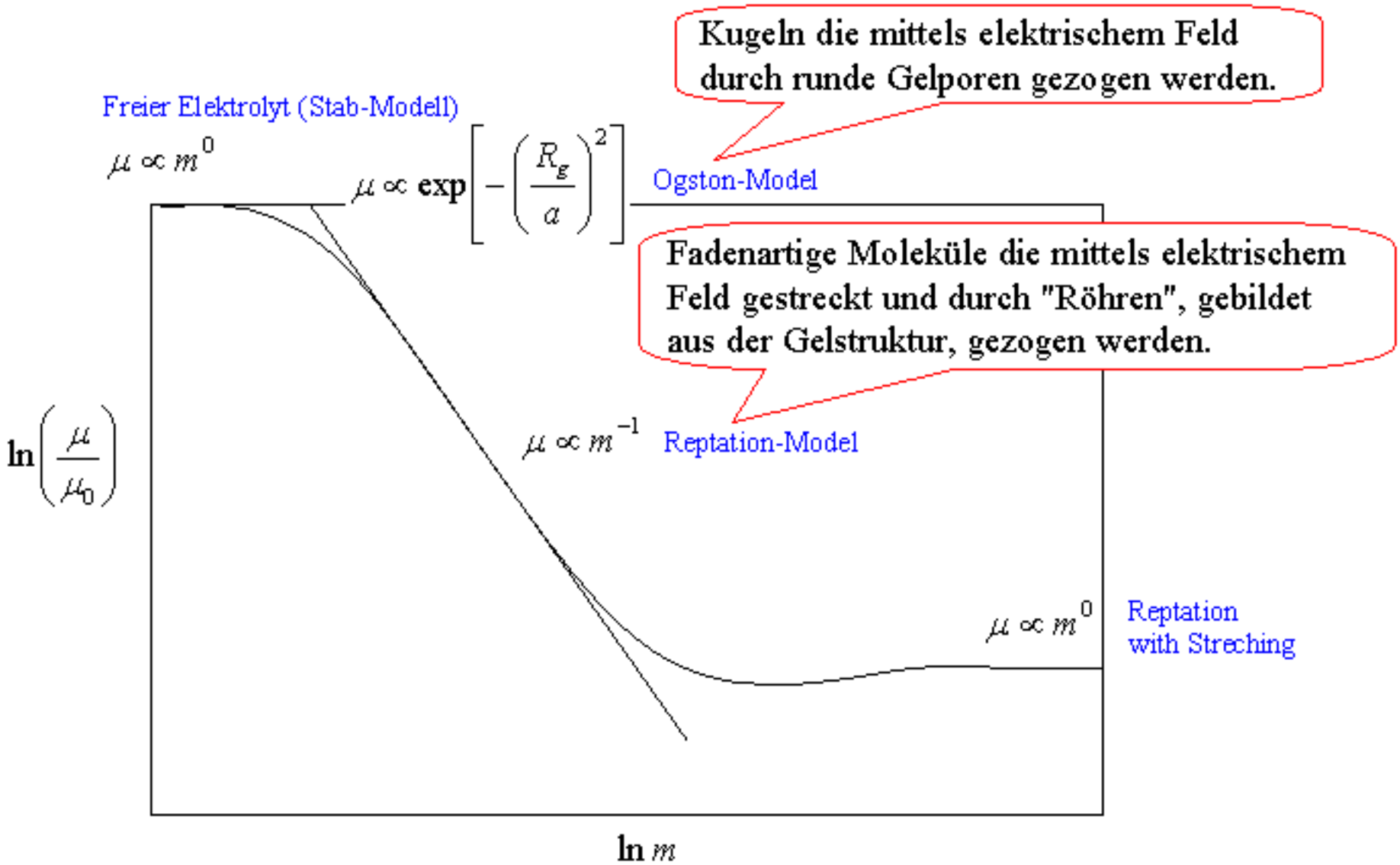
Leitfähigkeit im Linit unendlicher Verdünnung

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

	Verdünnt	Allgemein
Schwache Elektrolyte (teilweise dissoziiert)	$\Lambda = \Lambda_\infty \cdot \frac{1}{\sqrt{c}}$	$\Lambda = \Lambda_\infty \cdot \frac{K_c}{2c} \cdot \left\{ \left(1 + \frac{4c}{K_c} \right)^{1/2} - 1 \right\}$
Starke Elektrolyte (überwiegend dissoziiert)	$\Lambda = \Lambda_\infty$	$\Lambda = \Lambda_\infty - K \frac{1}{\sqrt{c}}$

Zusammenfassung Siebverhalten einer Trennmatrix

Unterschiedliches Siebverhalten abhängig von der Masse des Ions.



Grenzen der Detektion von Proteinen durch Elektrophorese

- Geringe Massenauflösung durch große Probenmenge

  Verbesserung durch Stacking im FlachGel -> Diskontinuierliche Elpho
- Geringe Massenauflösung durch Diffusion und Wärmeableitprobleme

  -> Kapillarelektrophorese
- Geringe Trenn-Geschwindigkeit durch schlechte Wärmeableitung
- Geringe Trennleistung da nur Masse der Proteine identifiziert wird

  -> Isoelektrische Fokussierung

  -> 2D- Elektrophorese

  -> Detektion durch Antikörper

  -> Detektion durch Picken und Massenspektrometrie
- Eingeschränkter Bereich der detektierbaren Proteinmasse

  -> Gel-Variation

  -> Pulsed Field Elektrophorese

Methoden der Elektrophorese

Flachgel-Elektrophorese

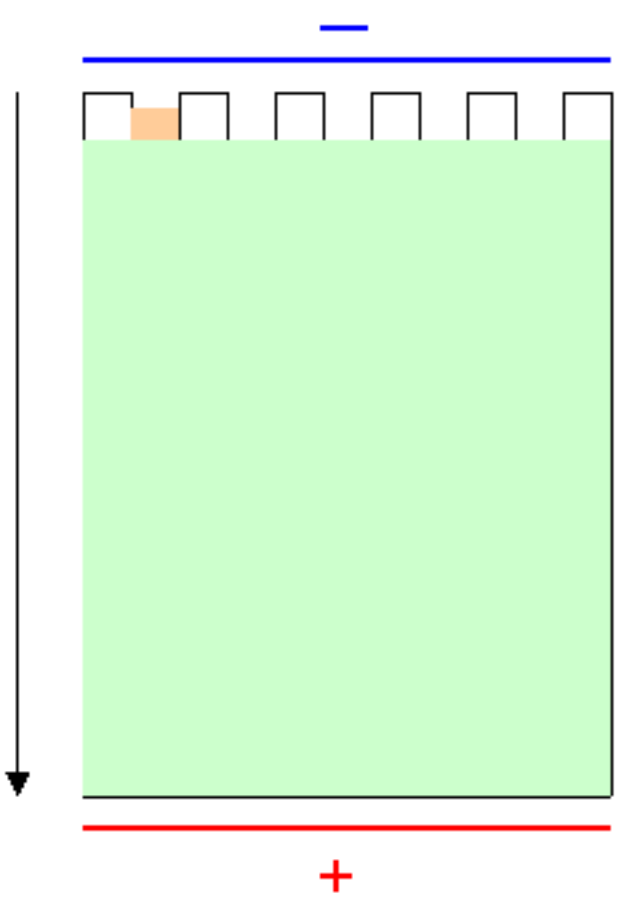
- Diskontinuierliche Elpho (hauptsächlich SDS-PAGE, sehr häufig)
- Pulsed Field Elpho (sehr selten, nur große DNA)
- Isoelektrosche Fokussierung (IEF, Auftrennung nach PI)
- Titration Curve Analysis (TCA, sehr selten da gemischt PI und m)
- 2D-Elektrophorese (Kombination IEF und SDS-PAGE)

Kapillar-Elektrophorese

- Kapillar-Zonen-Elektrophorese (CZE)
- IsoTachoPhorese (ITP)

SDS-PAGE

PolyAcrylamid GelElektrohorese PAGE



Probe in Ladetaschen

Elektrolyt niedriger Konzentration,
Aufbruch mit MercaptoÄthanol,
Ladung mit SDS

Trenn-Bereich

Feinporiges Gel mit Siebeffekt
(Reptation-Modell, m^{-1})

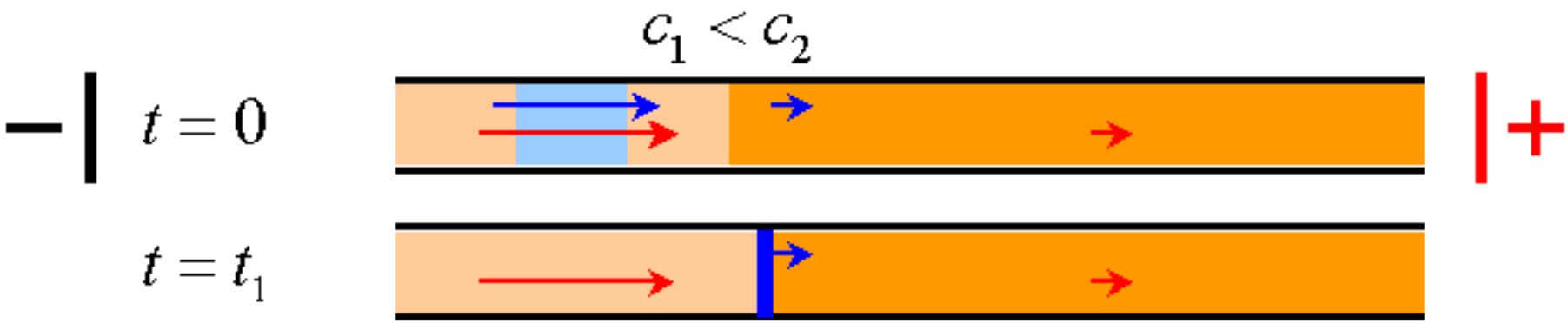
Träger-Elektrolyt hoher Konzentration

Auftrennung der Probe nach Molekulargewicht

Diskontinuierliche Elektrophorese bei SDS-PAGE: **Stacking**

Verbesserung der Auflösung durch Steigerung der Probenkonzentration (10 x)

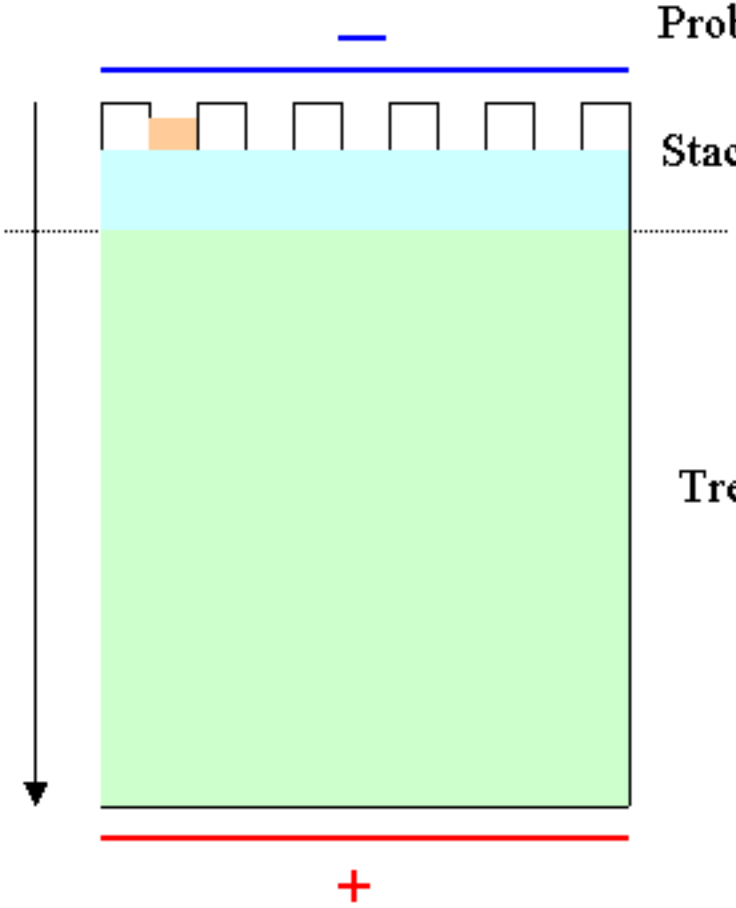
- Flach-Gel-Elektrophorese mit Konzentrations-Sprung (Anstieg) des Träger-Elektrolyten
- *Nebeneffekt:* Ionen unterschiedlicher Beweglichkeit ordnen sich in Banden an, die sich mit gleicher Geschwindigkeit bewegen (wie bei IsoTachoPhorese)



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

Stacking-Gel bei SDS-PAGE

Diskontinuierliche Elektrophorese PAGE



Probe

Elektrolyt niedriger Konzentration,
Aufbruch mit MercaptoÄthanol,
Ladung mit SDS

Stacking-Bereich

Großporiges Gel ohne Siebeffekt
(Ogston-Modell, m^0)

Träger-Elektrolyt mittlerer Konzentration

Ankonzentration der Probe

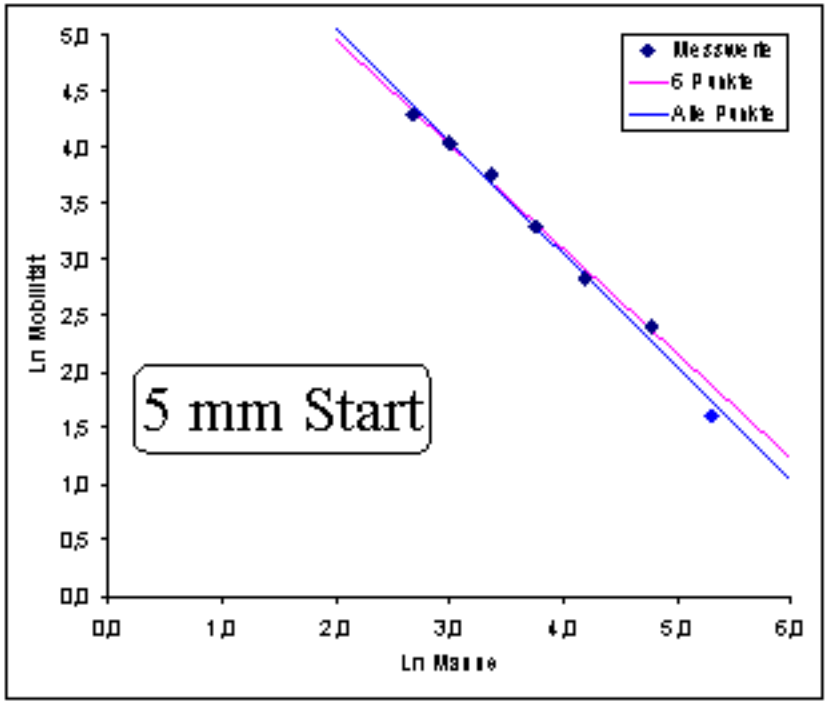
Trenn-Bereich

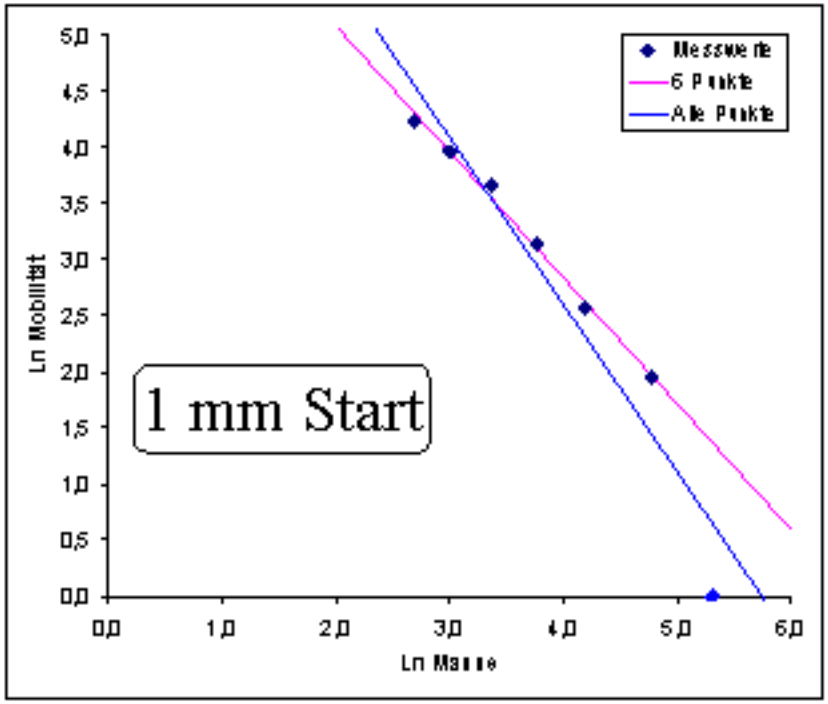
Feinporiges Gel mit Siebeffekt
(Reptation-Modell, m^{-1})

Träger-Elektrolyt hoher Konzentration

Auftrennung der Probe nach Molekulargewicht

Beispiel Laufstrecken

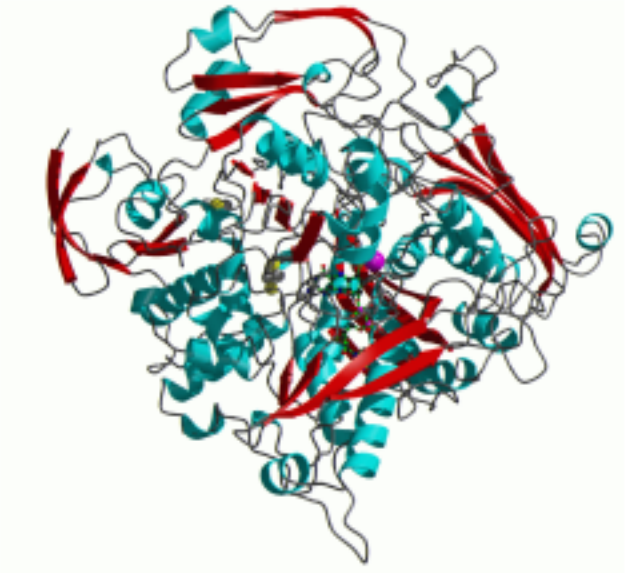




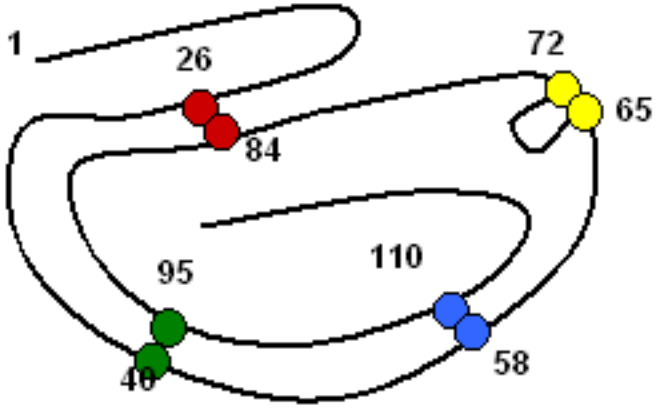
$\delta = 1{,}005$ alle Pkt $\delta = 0.93$ 6 Punkte $\delta = 1{,}5$ alle Pkt $\delta = 1.1$ 6 Punkte

Masse	Laufstrecke
200	1
119	7
66	13
43	23
29	39
20	53
15	69

Probenpräparation für SDS-PAGE 1



Röntgenstrukturanalyse:
komplexe, stark vernetzte 3-dimensionale Strukturen



schwarz:

Aminosäurekette (Grundstruktur jedes Proteins)

farbig:

Verbindung einiger Aminosäuren
zu auf der Kette weiter entfernten Aminosäuren
(= Schwefel-Brücken)
dadurch Quervenetzung der Kette.

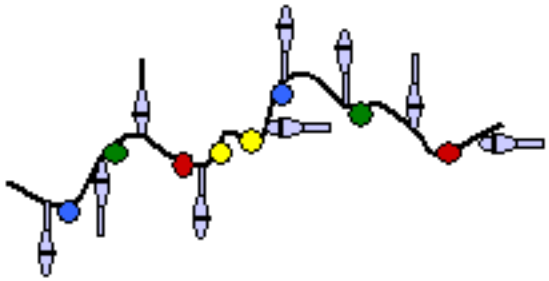
Probenpräparation für SDS-PAGE 2

Wirkung von MercaptoÄthanol

Denaturierung:

Aufbrechen von Quervernetzungen (Reduktion von S-S-Brücken),
Umwandlung des 3D-Knäuel in einfache, gestreckte Aminosäurekette

Wirkung von SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)



Ladung:

Anlagerung von SDS-Molekülen führt zu negativer Gesamtladung

Vorteil: Durch gleichmäßige negative Ladung und Fadenstruktur => Proteine wandern in Abhängigkeit von ihrer Größe => Laufstrecke wird zum Maß ihrer Größe.

Nachteil: Denaturierende Vorbehandlung zerstört 3D-Struktur der Proteine.
Prozess meist irreversibel

SDS-PAGE Detektion

In Anschluß an die Auftrennung:

Protein-Nachweis durch

- Coomassie-Blue-Färbung
- Fluoreszenz-Färbung
- Silber-Färbung
- Antikörper-Reaktionen (Blotten)
- Picken (Massenspektrometer)

Detektion durch Schwermetallfärbung

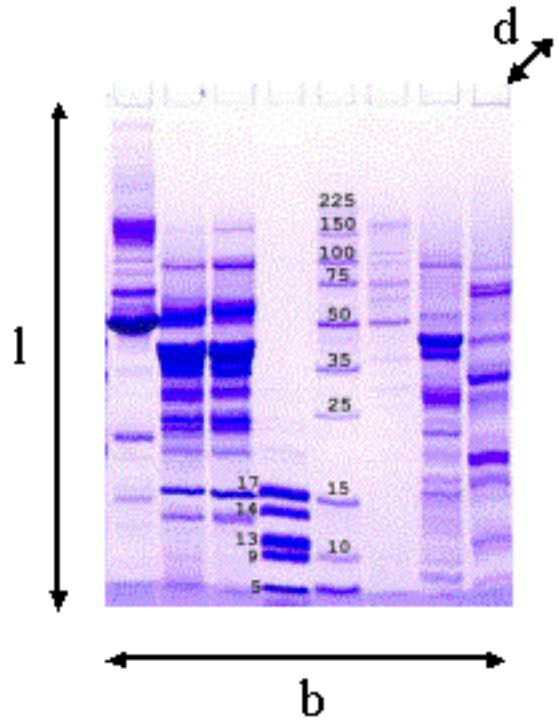
Ablagerung von metallischen Partikeln (Gold, Zink, Silber) an Proteinen und DNA

Silberfärbung:

- Ag+-Ionen binden an Biomoleküle
- Reduktion von Ag-Kationen zu metallischen Ag durch starke Reduktionsmittel (Formaldehyd)
  ähnlich wie fotografischer "Entwicklungs Prozeß" $Ag^+ + 1e^- \rightarrow Ag$
- Reduktionsreaktion startet an Keimen =>
  Nähe zu Proteinen wird bevorzugt, wenig Keime im restlichen Gel.
- Reduktion zu metallischem Ag (braun-schwarz) ist Endpunktreaktion

Wärmeentwicklung während der Elektrophorese

Aufheizung des Flach-Gels aufgrund von Ohmscher Wärme



$100 \cdot 100 \cdot 0{,}5\ mm^3$

$U = 300\ V$

$I = 50\ mA$

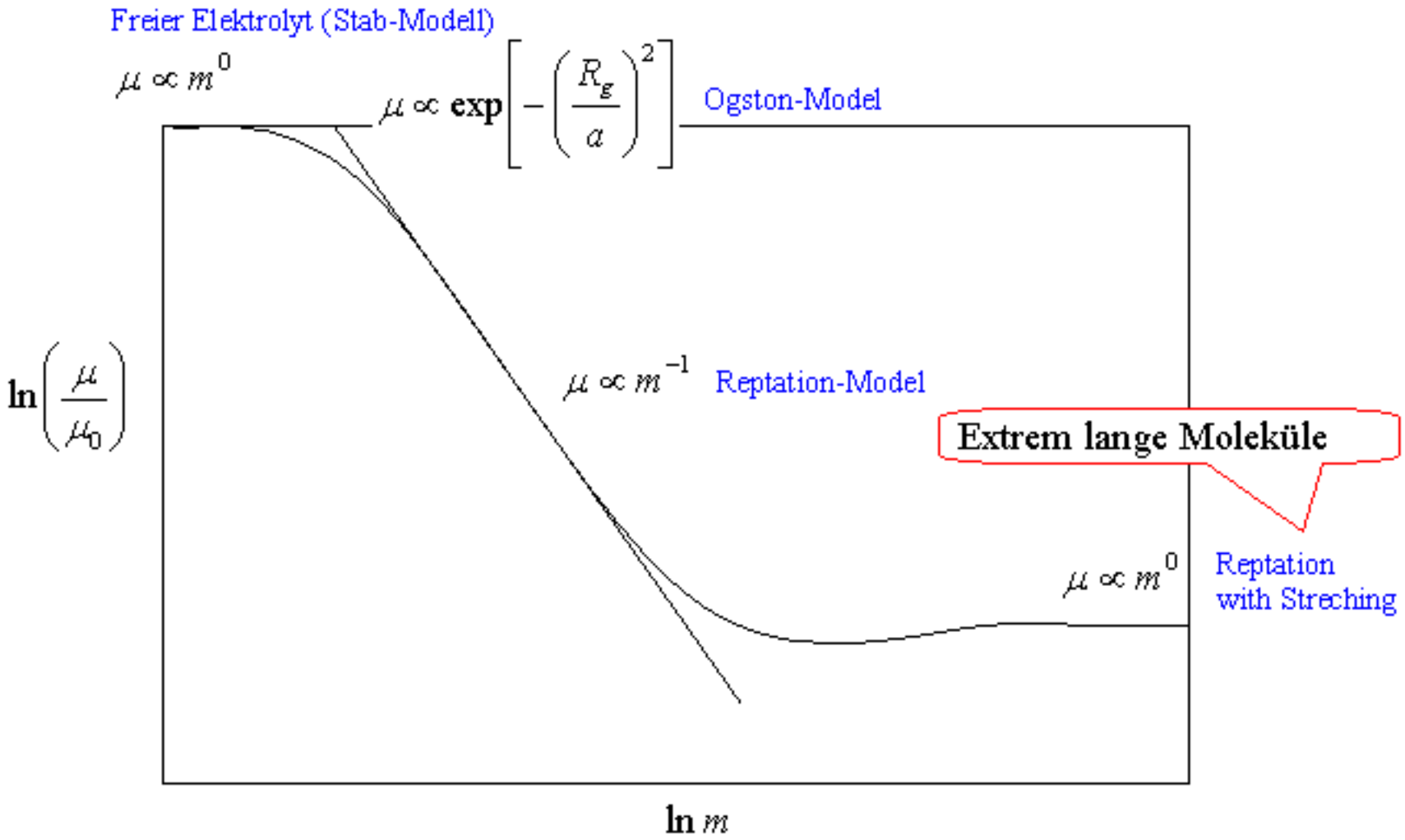
$P = 15W$

$t = 1\ h$

Bei Überhitzung

- Veränderung der Laufeigenschaften (>> 50 °C)
- Zerfall der Proteine

Nachweis extrem großer Moleküle



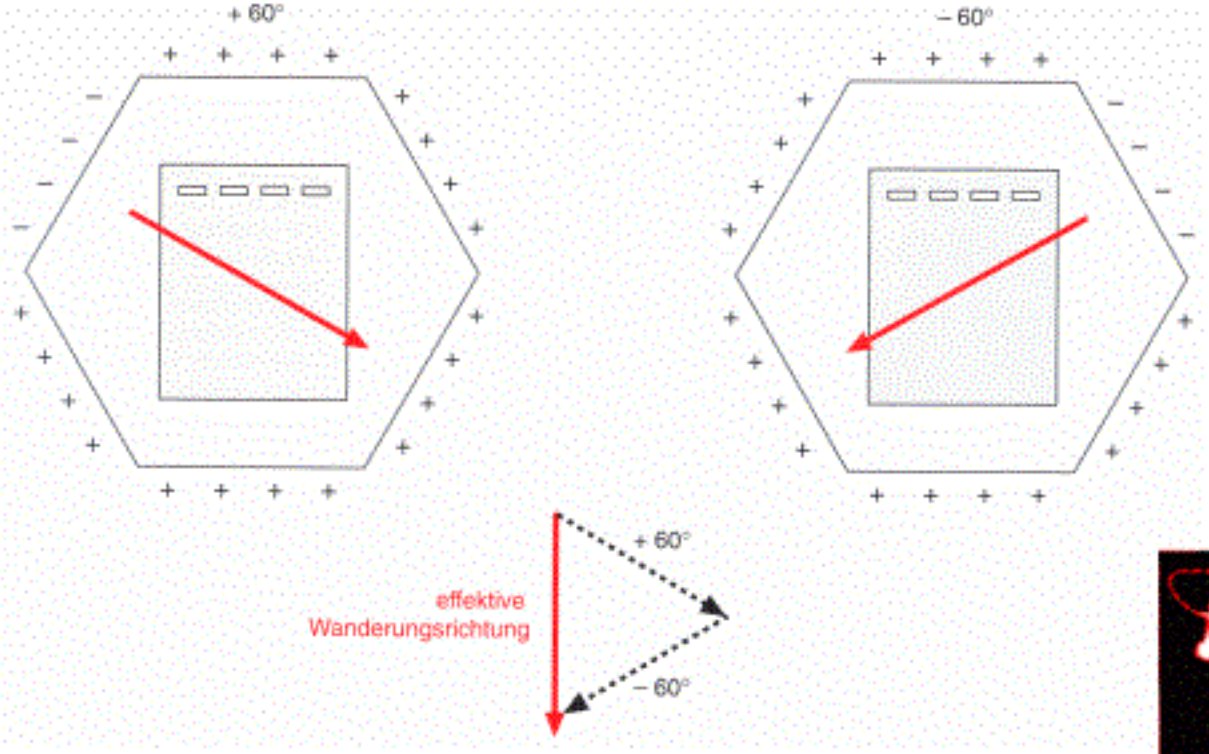
Extrem große Moleküle: **Pulsed Field Elektrophorese**

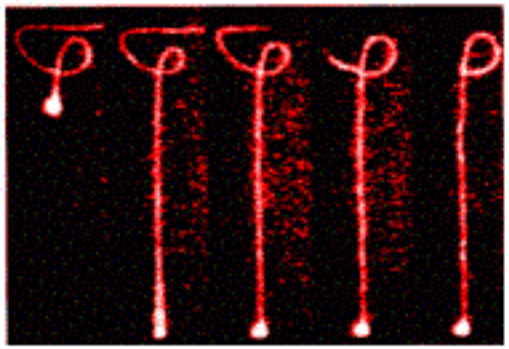
Auftrennung sehr großer DNA im Bereich m^0 im FlachGel

Separation nach Molekulargewicht

Lange geladene Moleküle werden durch elektrisches Feld 'entwirrt'

Bewegungsgeschwindigkeit bestimmt durch Entwirrzeit





Chemisches Gleichgewicht: **Das Massenwirkungsgesetz**

Chemische Reaktion $$A + B \underset{v_1}{\overset{v_2}{\leftrightarrows}} C + D$$

Geschwindigkeit der Hin-Reaktion $v_1 \propto c_A \cdot c_B$

Geschwindigkeit des Rück-Reaktion $v_2 \propto c_C \cdot c_D$

Gleichgewicht $v_1 = v_2$

Massenwirkunggesetz $K_c := \frac{c_C \cdot c_D}{c_A \cdot c_B}$ oder $K_c = \frac{[C][D]}{[A][B]}$

Beispiel MWG für Wasser: Der pH-Wert

Dissoziationsgleichgewicht

$$H_2O \underset{v_1}{\overset{v_2}{\leftrightarrows}} H^+ + OH^-$$

MWG für Wasser

$$K_{Diss} = \frac{c_{H^+} \cdot c_{OH^-}}{c_{H_2O}}$$

Bei 20°C

$$K_{Diss} = 1.2 \cdot 10^{-14} \frac{mol^2}{l^2}$$

pH-Wert

$$pH := -\log\left(c_{H^+}\right)$$

neutrales Wasser

$$c_{H^+} = c_{OH^-} = \sqrt{K_{Dis}} \sim 10^{-7} \frac{mol}{l}$$

$$pH \sim -\log 10^{-7} \frac{mol}{l} = 7$$

pH-Wert-Berechnung von Säuren und Basen

0.1 molare HCl

$$H_2O + HCl \leftrightarrows H_3O^+ + Cl^-$$

starke, verdünnte Säure

$$\alpha \approx 1 \qquad c_{H_3O^+} = 10^{-1} \cdot \alpha \approx 10^{-1} \frac{mol}{l}$$

pH = 1

0.1 molare CH_3COOH

$$H_2O + CH_3COOH \leftrightarrows H_3O^+ + CH_3COO^-$$

schwache, verdünnte Säure

$$\alpha \approx 0.01 \quad c_{H_3O^+} = 10^{-1} \cdot \alpha \approx 10^{-3} \frac{mol}{l}$$

pH = 3

0.1 molare NaOH

$$H_2O + NaOH \leftrightarrows H_3O^+ + OH^-$$

starke, verdünnte Base

$$\alpha \approx 1 \qquad c_{OH^-} \approx \alpha \cdot 10^{-1} \frac{mol}{l}$$

$$c_{H_3O^+} = \frac{K_w}{c_{OH^-}} = \frac{10^{-14} \frac{mol^2}{l^2}}{\alpha \cdot 10^{-1} \frac{mol}{l}} \approx 10^{-13} \frac{mol}{l}$$

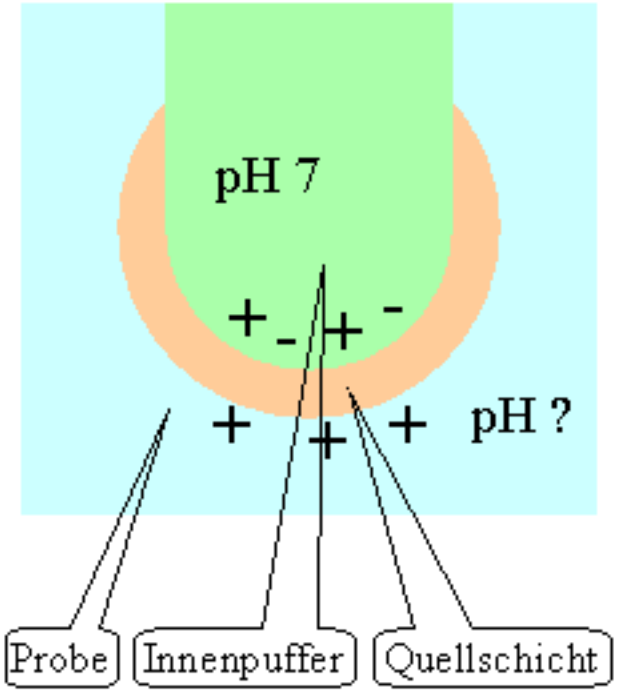
pH = 13

Konventionelles pH-Messgerät

Reaktionen an der Glasmembran

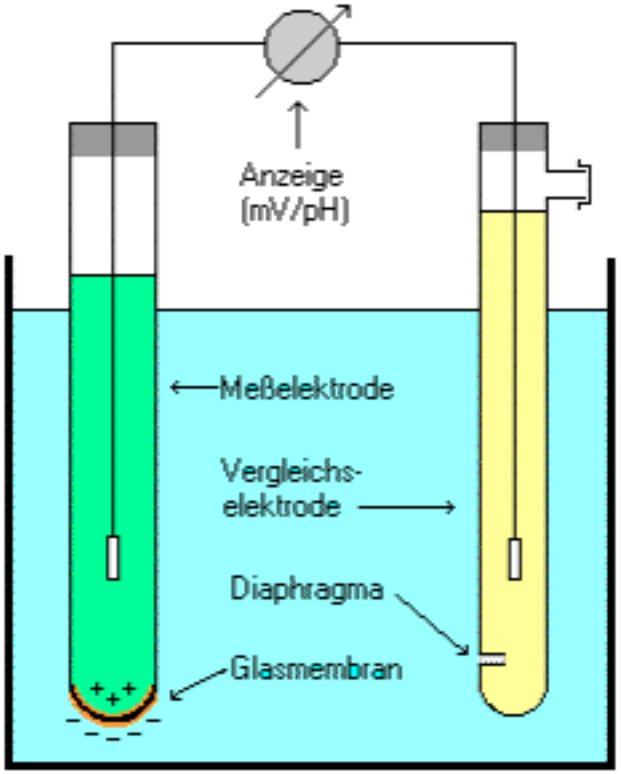
Ladungs-Anlagerung an Quellschicht

- Innen konstanter pH
- Außen Meßflüssigkeit

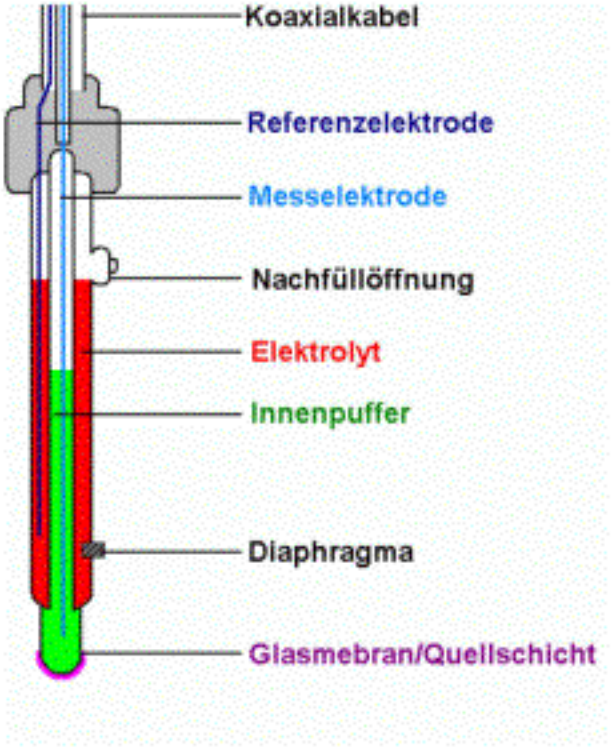


Referenz-Elektrode

Spannungsmessung der Hydrat-Anlagerung (elektrostatische Anziehung) gegen bekannte Referenz



Einstabmeßkette



Gleichungen der pH-Messung

Nernst'sche Gleichung

$$E = E^0 - \frac{RT}{\nu F} \ln\left(\frac{H^+_{Mess}}{H^+_{Ref}}\right)$$

Vereinfacht

$$E = E^0 - t(7 - pH)$$

=> 2 Parameter die kalibriert werden müssen

Der PI als alternativ detektierbare Eigenschaft von Proteinen

Auf der DNA werden durch Basen-Paare kodiert:

20 unterschiedliche Aminosäuren

Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile

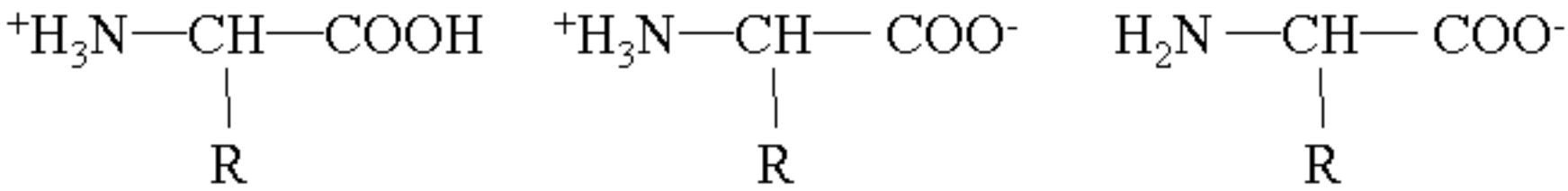
Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Tyr Trp Val

mittleres Molekulargewicht 110 Da

Proteine sind Kombination von 50 – 2.000 Aminosäuren

Isoelektrischer Punkt einer Aminosäure ohne Seitenkette

Unterschiedliche Ladungszustände einer Aminosäure



AS^+ AS^0 AS^-

$$pH = pK_1 + \log \frac{[AS^0]}{[AS^+]}$$

$$pH = pK_2 + \log \frac{[AS^-]}{[AS^0]}$$

Ladungsneutralität $[AS^+] = [AS^-]$

+ Seitenkette R

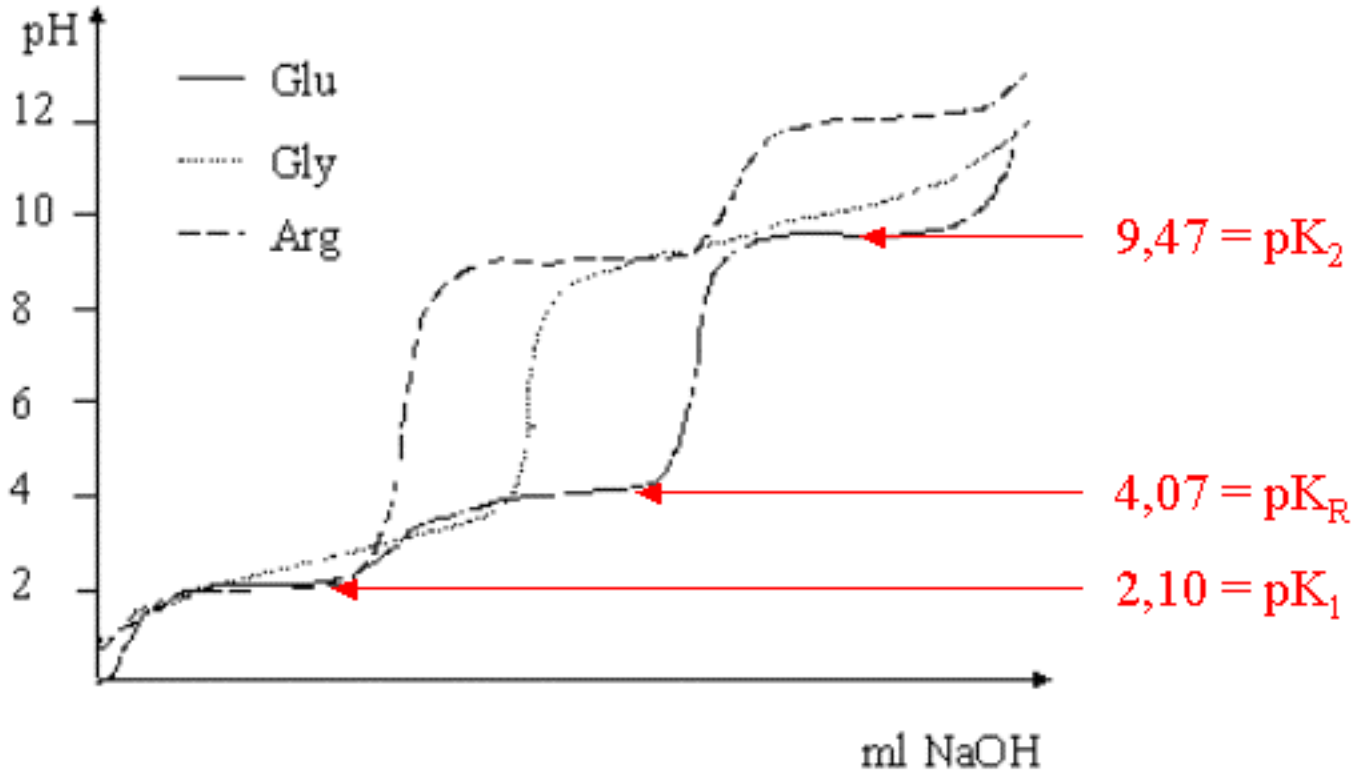
Isoelektrischer Punkt $pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$

Reale Isoelektrische Punkte einiger Aminosäuren

pK-Werte der ionisierenden Gruppen einiger α-Aminosäuren bei 25 °C

Aminosäure	*pK1 -COOH*	*pK2 -NH3+*	*pKR Seitenkette*
Glycin	2,35	9,78	
Arginin	1,82	8,99	12,48
Glutaminsäure	2,10	9,47	4,07
Asparaginsäure	1,99	9,90	3,90
Lysin	2,16	9,18	10,79
Tyrosin	2,20	9,17	10,13
Histidin	1,82	9,11	6,00

Messung des pK von Aminosäuren durch Titration

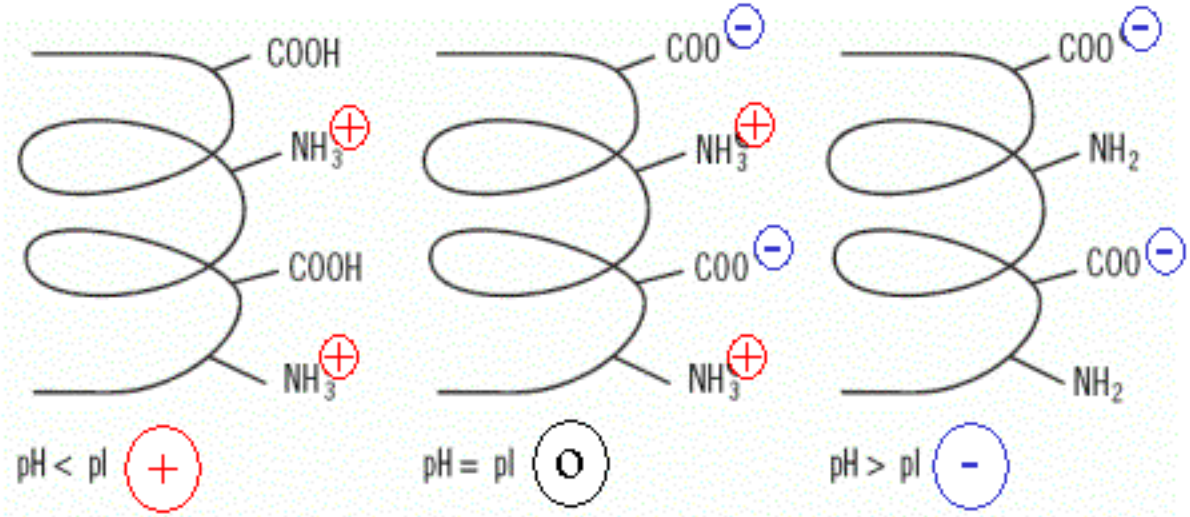


Aminosäure	*pK1 -COOH*	*pK2 -NH3+*	*pKR Seitenkette*
Glutaminsäure	2,10	9,47	4,07

Isoelektrischer Punkt von Proteinen (viele Aminosäuren)

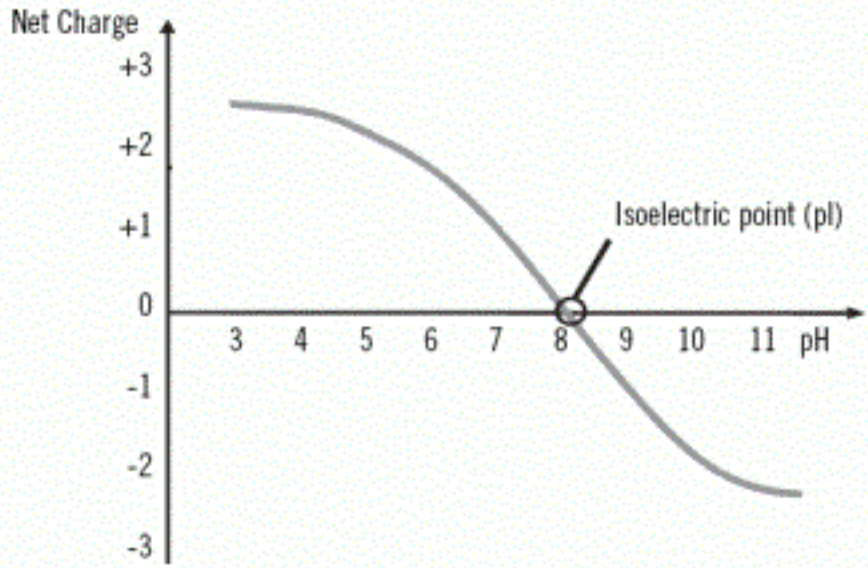
Isoelektrischer Punkt (pI)

- pH Wert, bei dem die Nettoladung eines Moleküls neutral ist
- Am pI gilt $\mu = 0$
  Das Molekül bewegt sich im elektrischen Feld nicht mehr



Proteine sind amphoter, d.h.

- sie können positive, negative oder keine Nettoladung tragen
- Nettoladung abhängig vom pH in ihrer Umgebung



Messung des PI durch Titration-Curve-Analysis (TCA)

Versuchsaufbau

- Linearer pH-Gradient in einem Gel
- Elektrisches Feld geeigneter Polarität senkrecht dazu

=>

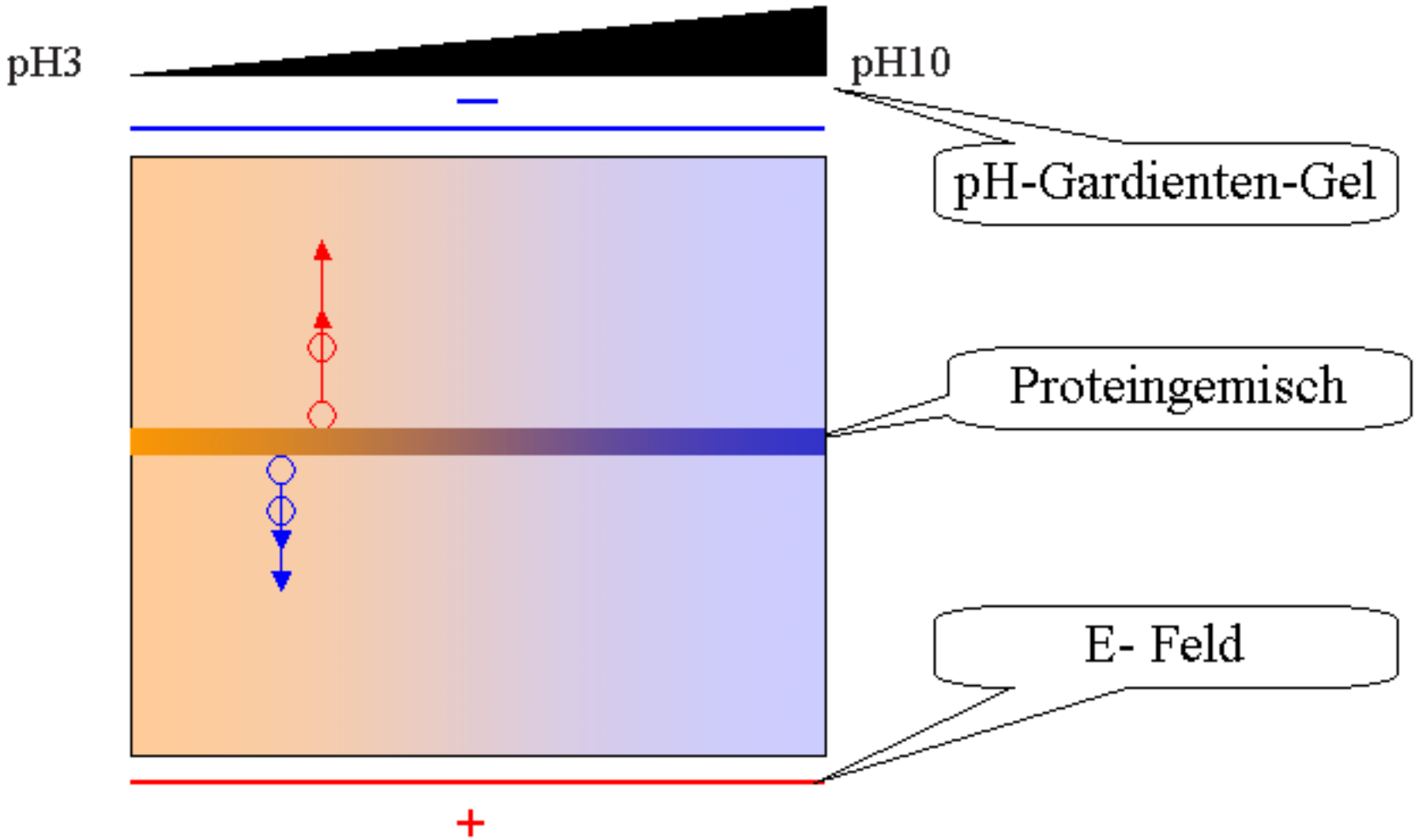
Titration Curve Analysis (TCA)

=

Wanderung der Proteine im elektrischen Feld des Gels mit unterschiedlicher Geschwindigkeit

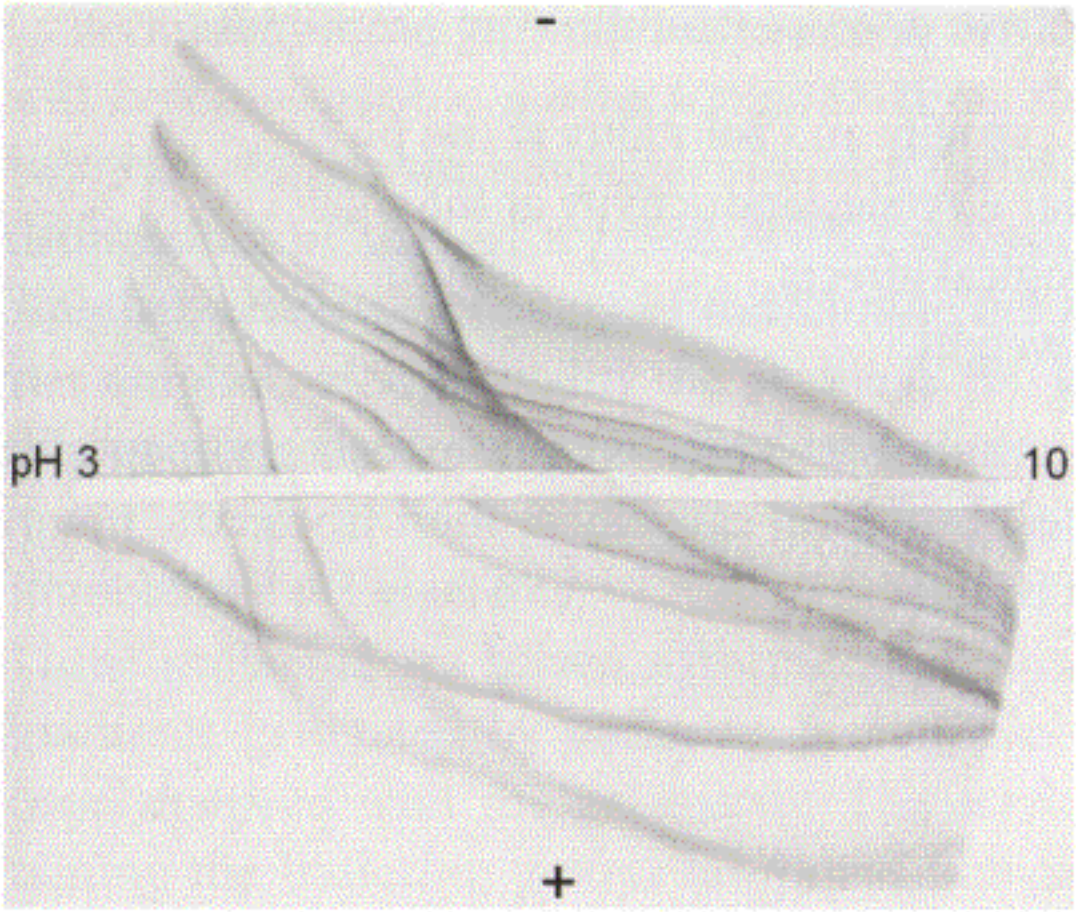
$$v \propto \mu(q) \cdot E$$

Titration-Curve-Analysis (TCA)

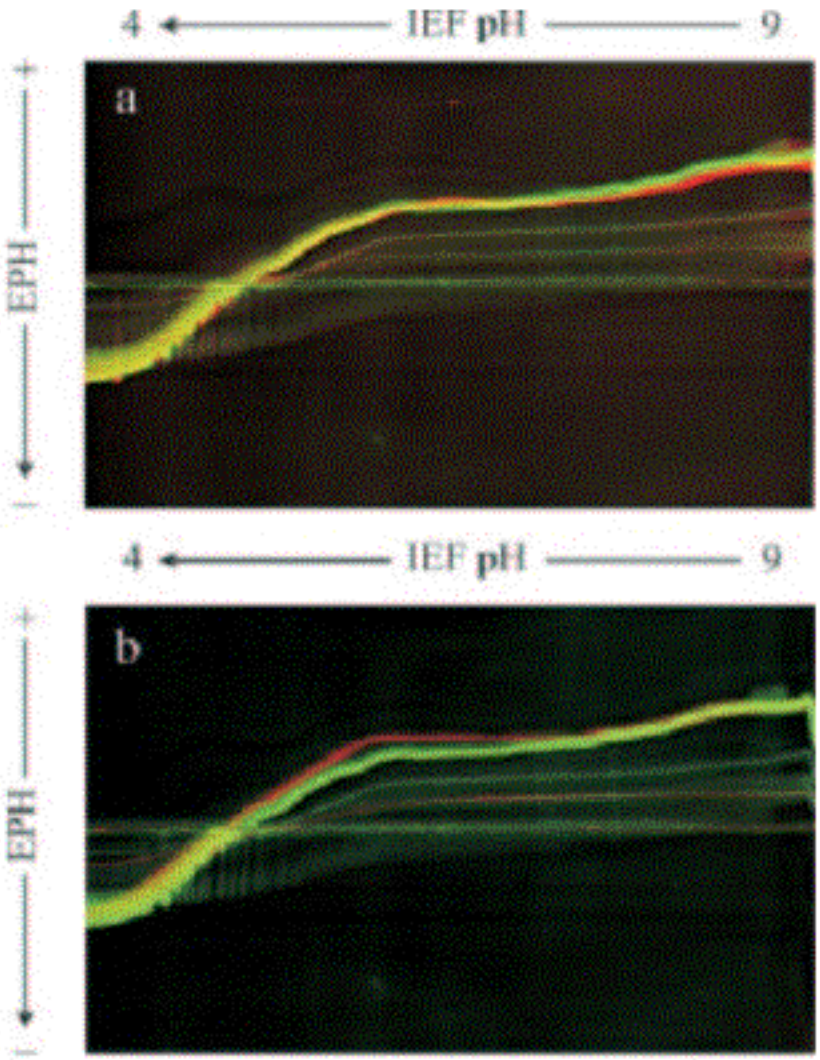


Meßwert : Produkt aus Masse und Ioselektrischem Punkt $v \propto \mu(q) \cdot E$

Titration-Curve-Analysis (TCA)

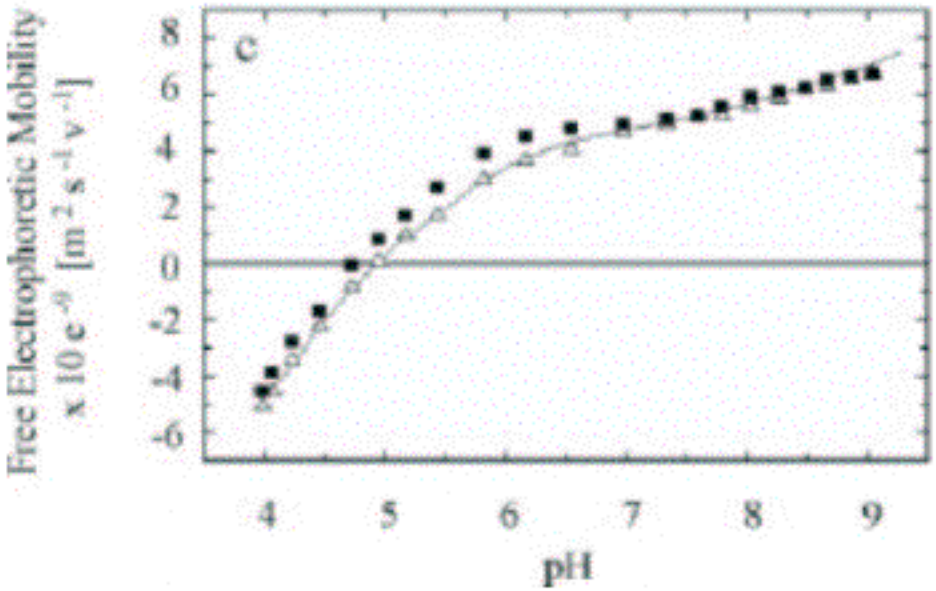


Titration-Curve-Analysis (TCA)



Human Serum Albumin bei FSGS

(focal segmental glomerulosclerosis)



Messung des Isoelektrischen Punkts durch IEF

Versuchsaufbau

- Linearer pH-Gradient in einem Elektrolyten
- Elektrisches Feld geeigneter Polarität parallel dazu

=>

Isoelektrische Fokussierung (IEF)

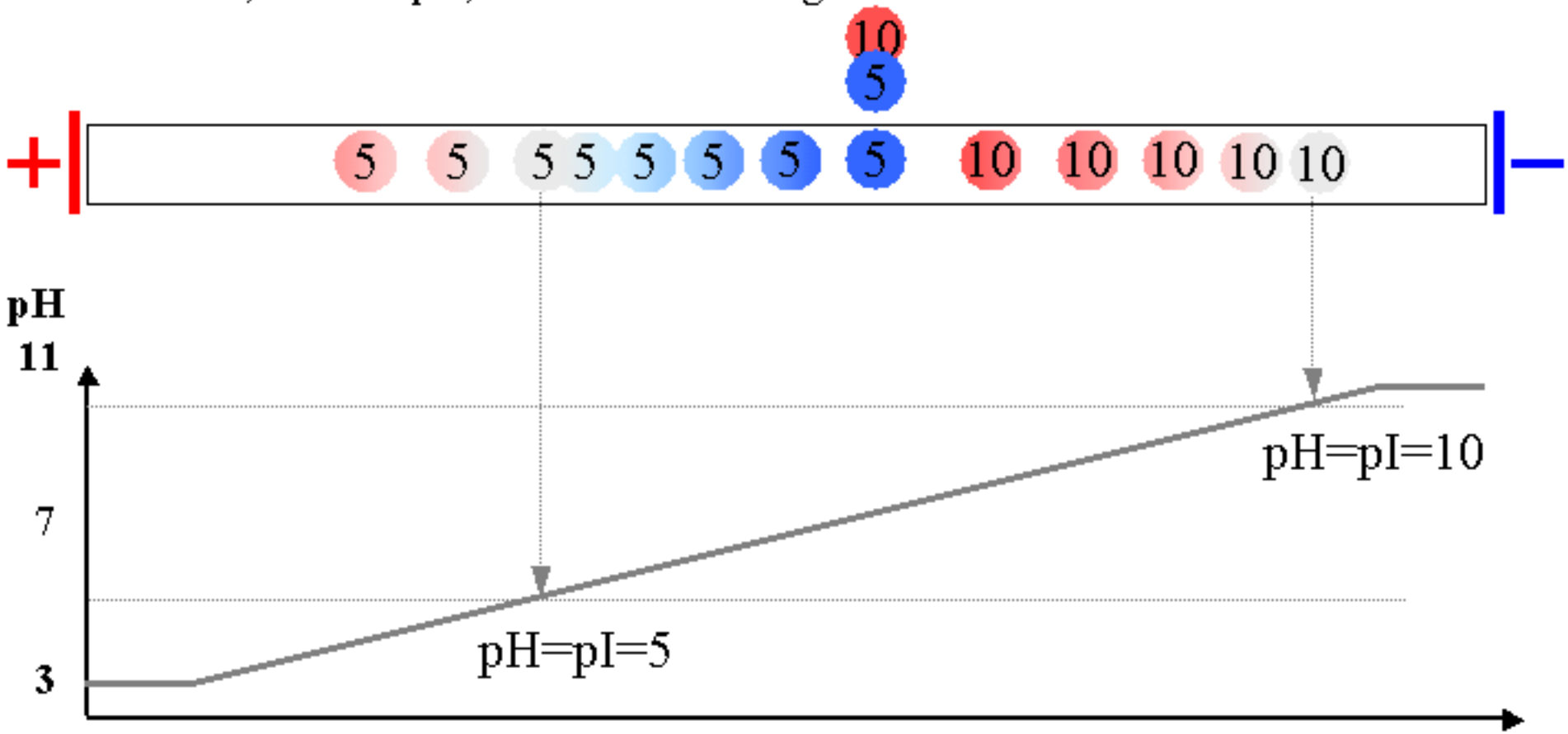
=

Wanderung der Proteine bis Stillstand wegen verschwindender Ladung

$$v \propto \mu(q) \cdot E = 0$$

Isoelektrische Fokussierung (IEF) I

Wanderung eines Proteins im elektrischen Feld, bis sein isoelektrischer Punkt erreicht ist, d.h. der pH, an dem die Ladung des Proteins verschwindet



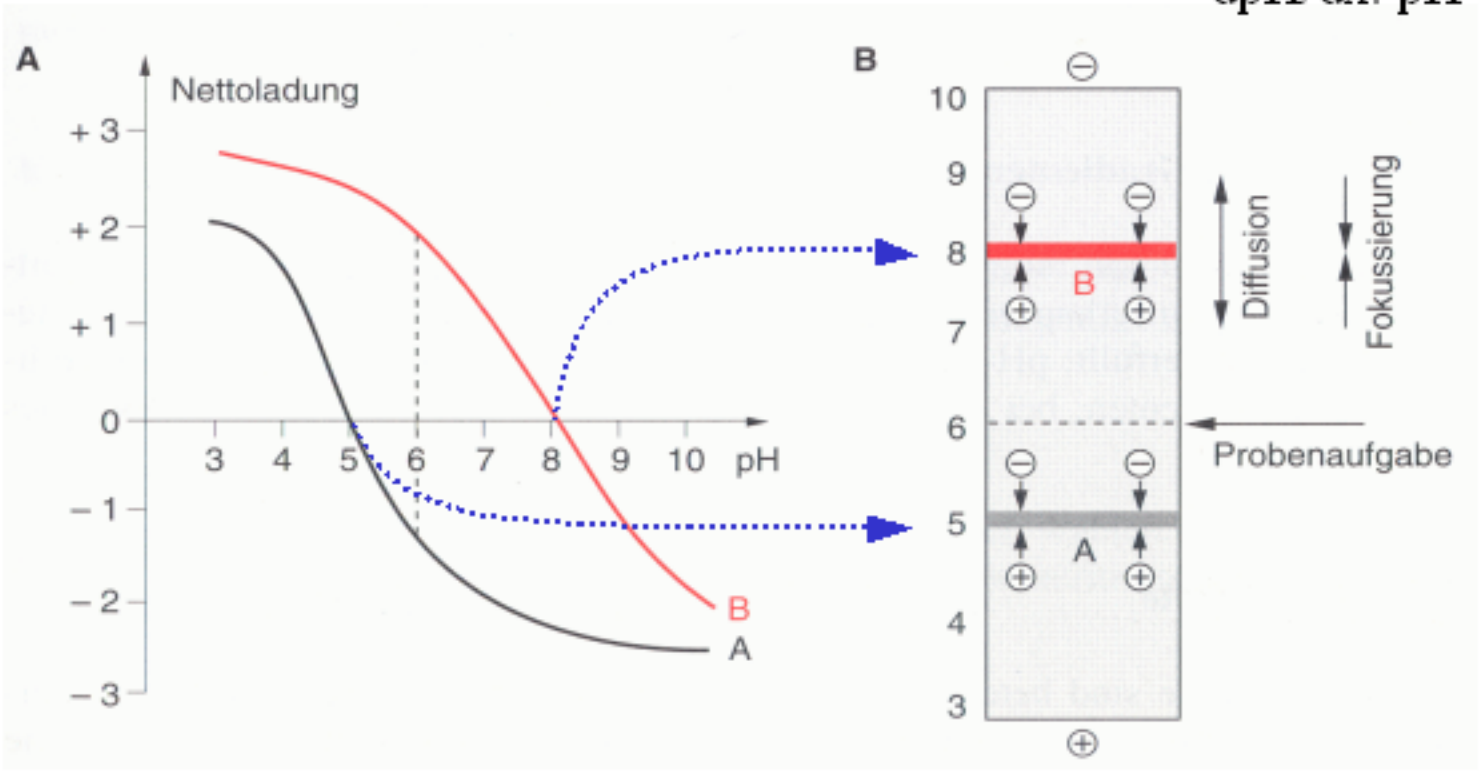
Spannung	30kV
Zeit	12 h

Isoelektrische Fokussierung II

- elektrophoretische Separation von Molekülen nach ihrem Ladung-Nullpunkt
- Diffusion wirkt Fokussierung entgegen → Molekül wird erneut geladen und zum Ort seines pI "zurückgetrieben"
- Auflösung:

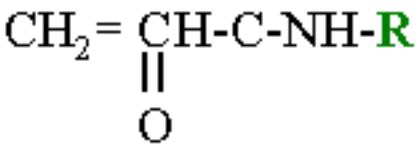
$$\Delta pI = \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

D: Diffusionskoeffizient
E: elektrische Feldstärke
dμ/dpH: Mobilitätssteigerung
dpH/dx: pH Gradient

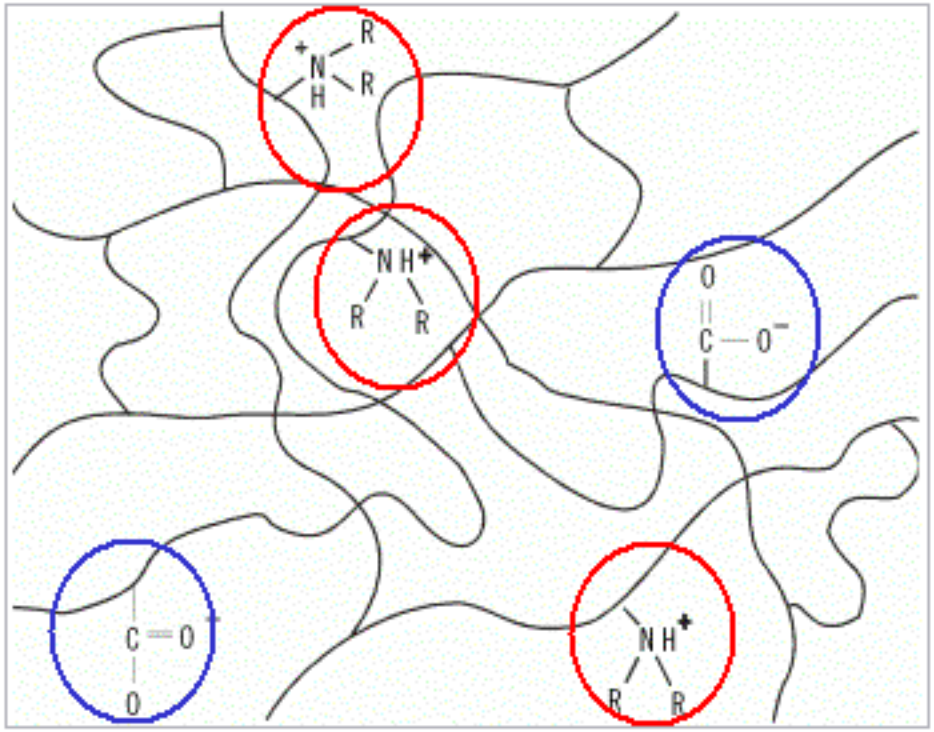


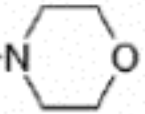
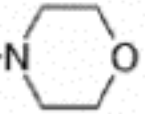
Herstellung eines stationären pH-Gradienten

Immobilized pH Gradient IPG



- Ampholyte sind Acrylamid-Derivate
- wenige Typen klar definierter Struktur werden in PAA Gele einpolymerisiert (Immobi
- lokales Mischungsverhältnis definiert lokalen pH, bei Herstellung des Gels

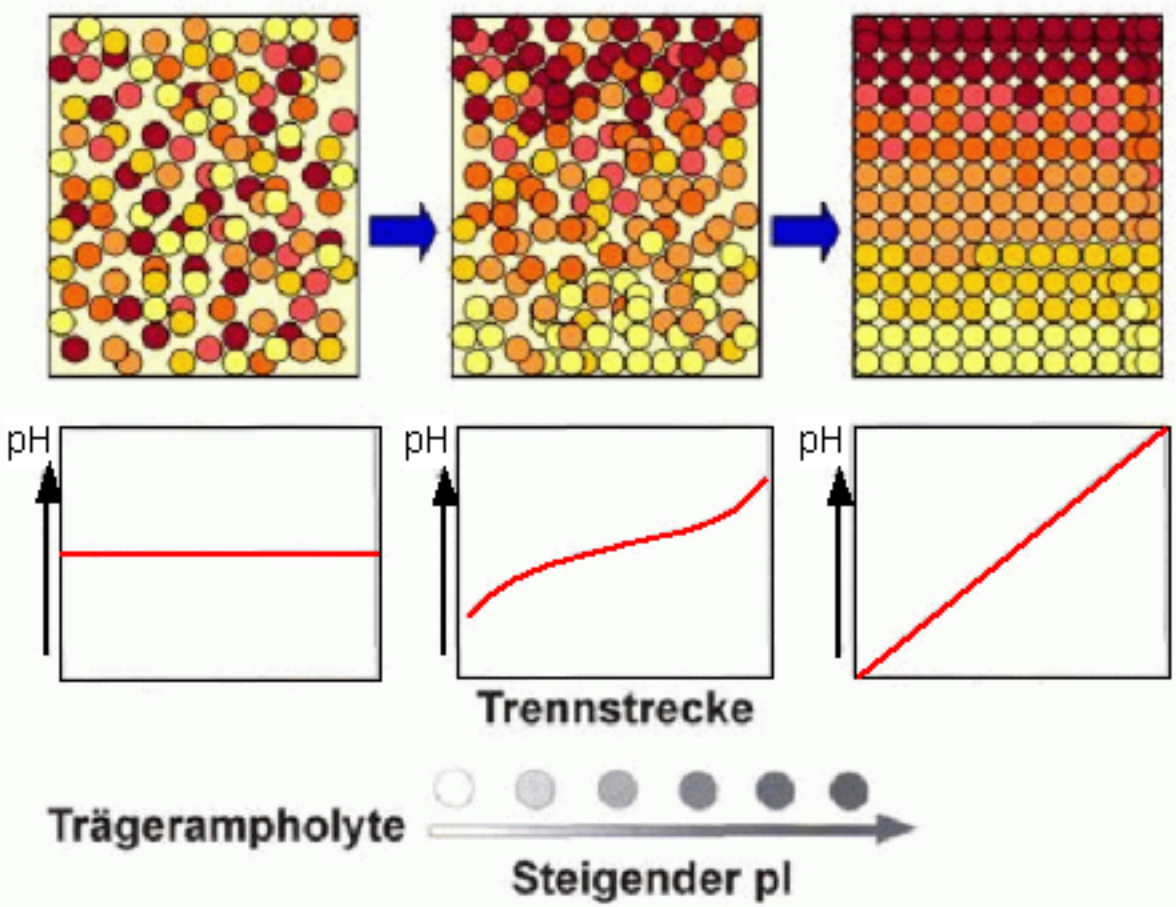


pK	Strukturformel
3,6	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}CH_2{-}COOH$
4,6	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}COOH$
6,2	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}N$ 
7,0	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}N$ 
8,5	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}N(CH_3)_2$
9,3	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}N(CH_3)_2$
10,3	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_3{-}N(C_2H_5)_2$
> 12	$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}(CH_2)_2{-}N(C_2H_5)_2$

Herstellung eines dynamischen pH-Gradienten

non-equlibrium pH gradient electrophoresis NEPHGE

→ Carrier Ampholyte: kleine amphotere Moleküle (Oligoamino/Oligocarbonsäuren, Sulfon/Phosphorige Säuren 300-900 Da) mit hoher Pufferkapazität an ihrem pI



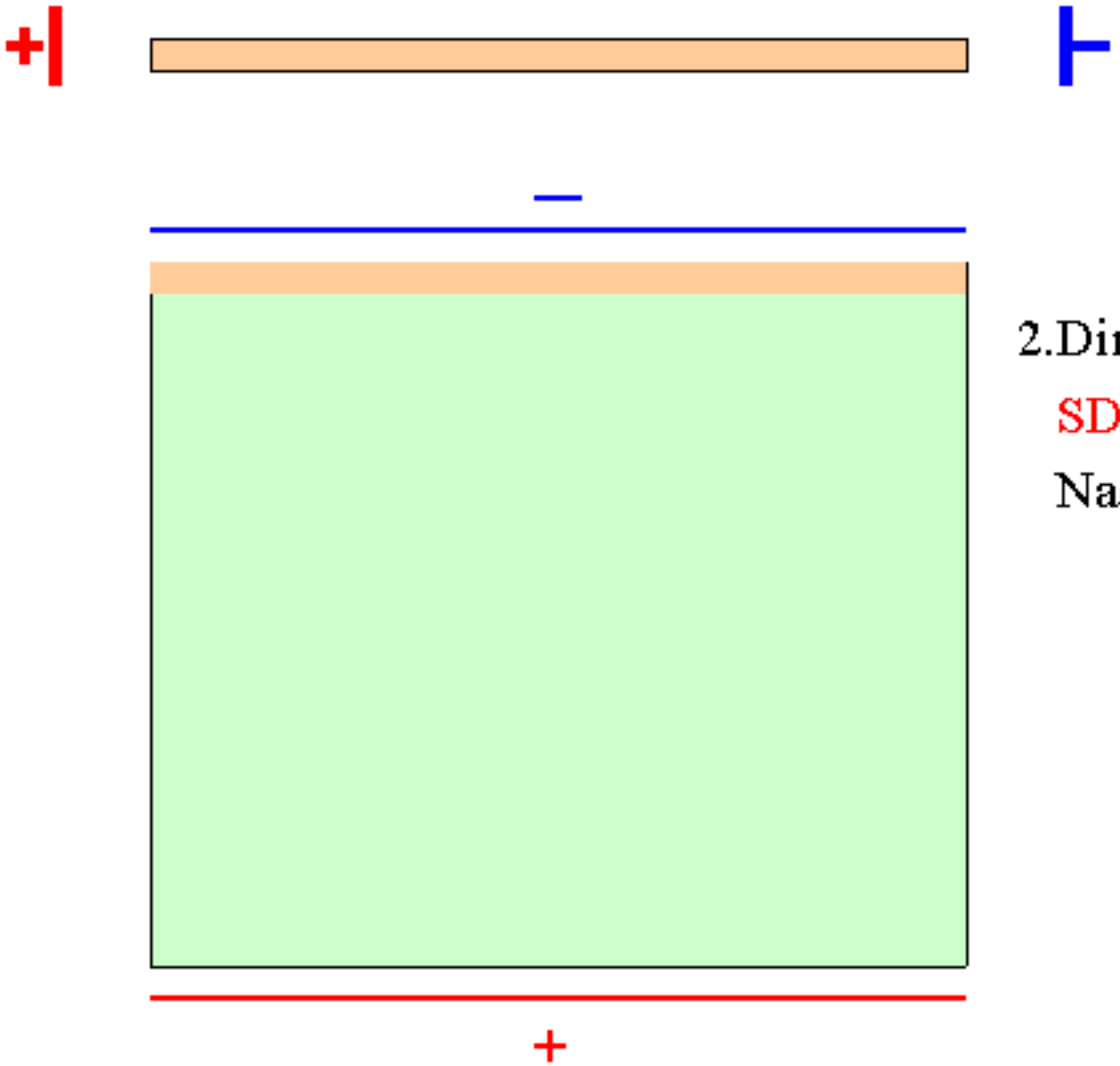
→ Mischung aus >100 verschiedenen Carrier Ampholyten mit unterschiedlichem pI

→ dynamischer pH-Gradient, baut sich nach Anlegen der Spannung durch gegenseitige Wechselwirkung auf

Kombination IEF mit SDS-PAGE: 2D Elektrophorese

1.Dimension der Auftrennung IEF

Nach Isoelektrischem Punkt PI

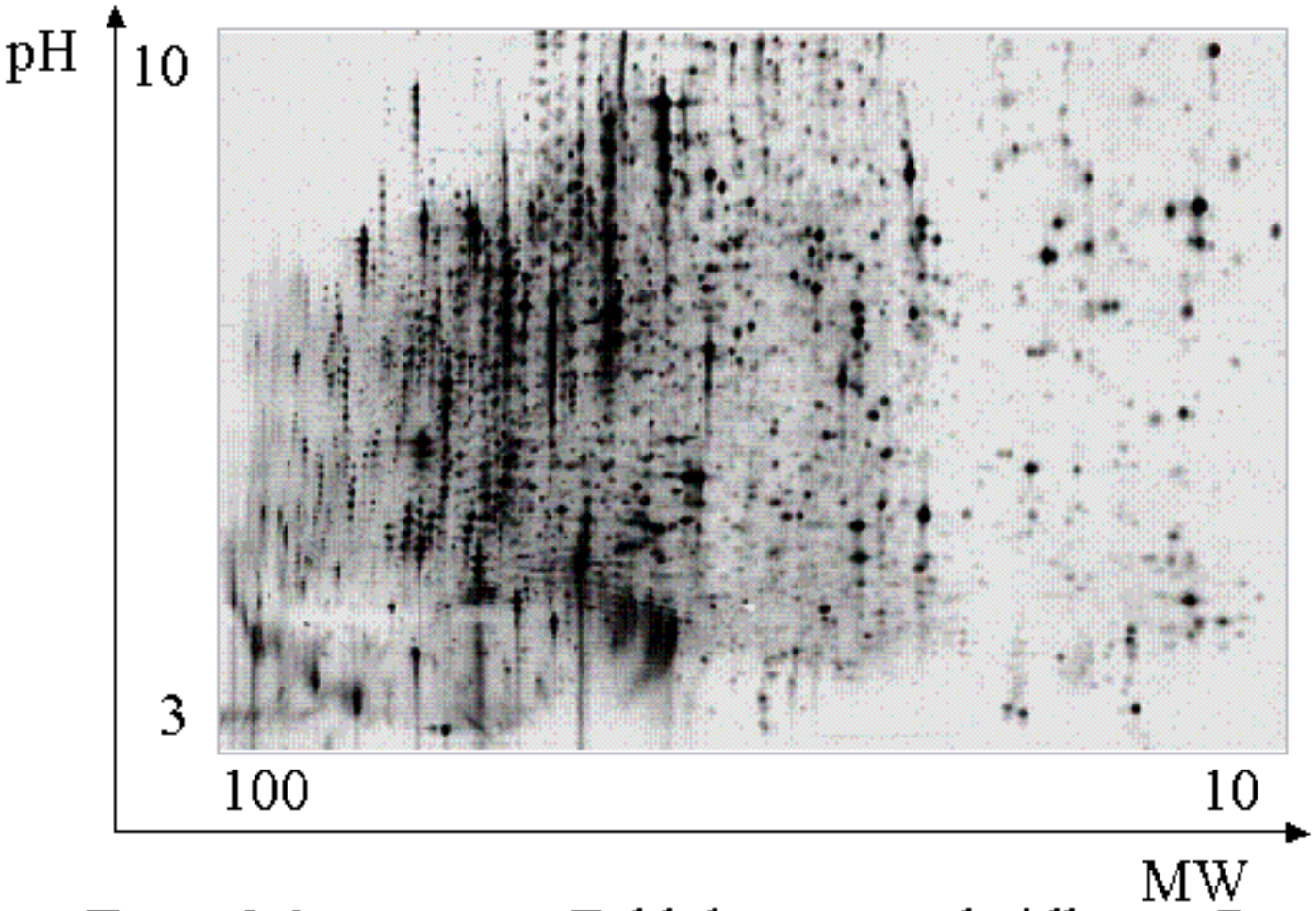


2.Dimension der Auftrennung:

SDS-PAGE

Nach Molekulargewicht

2D Elektrophorese

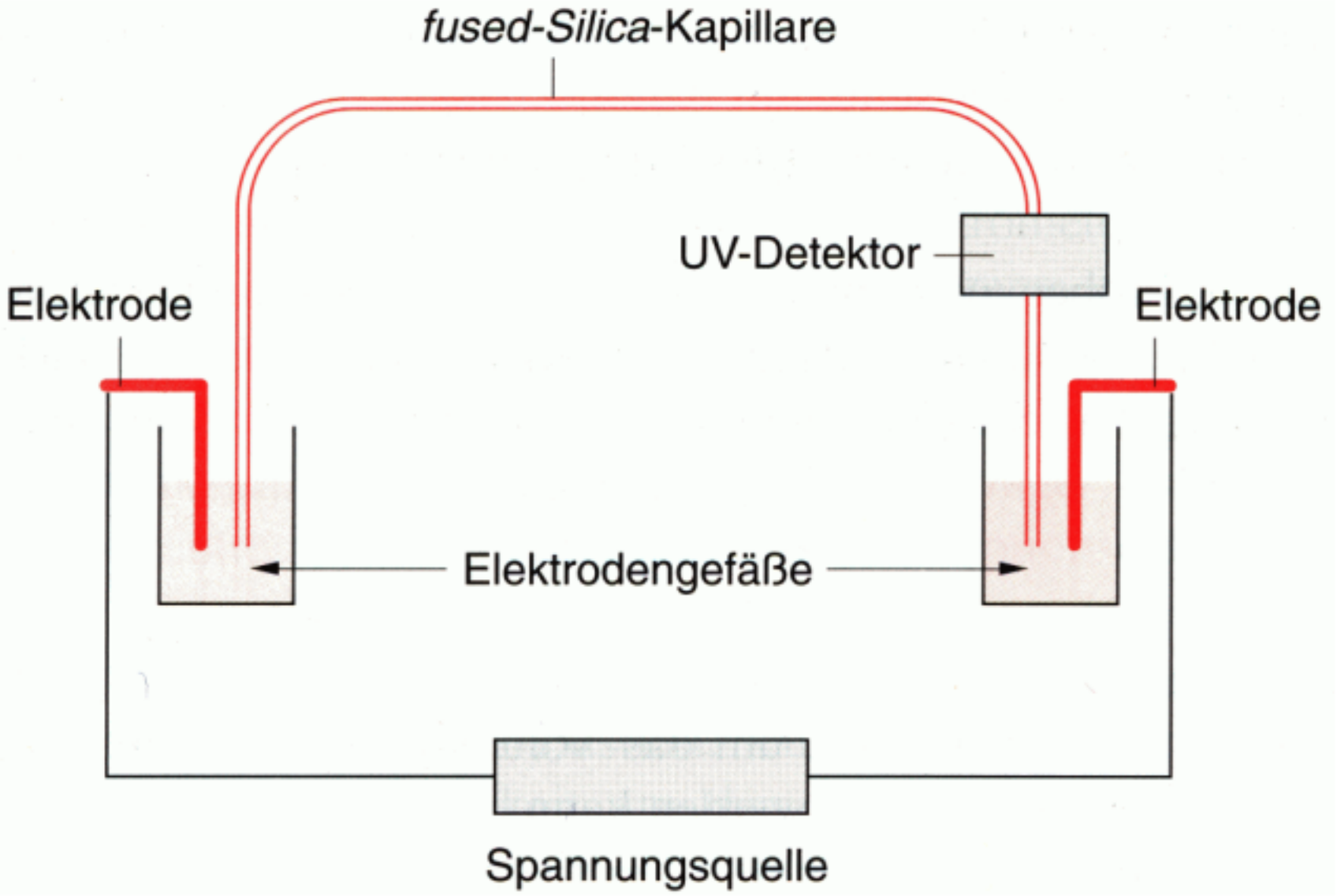


Probe:
Porcine Cortex Frontal

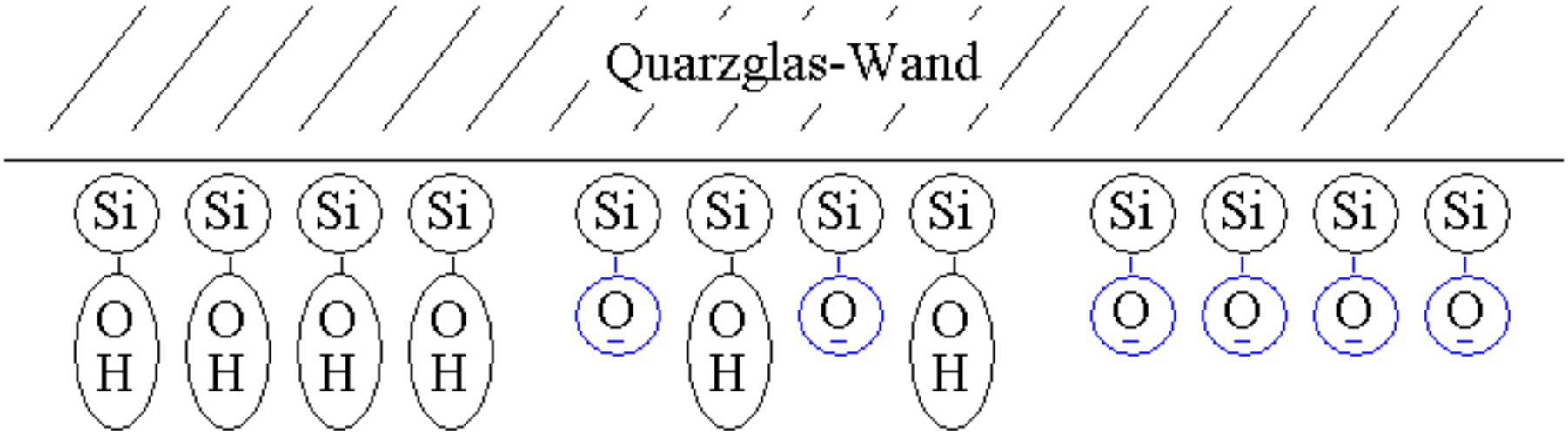
Trennleistung = Zahl der unterscheidbaren Proteine

1D-Gel: ca 10^2 2D-Gel: bis zu 10^4

Kapillar-Elektrophoresen



ElektroOsmotischer Fluß an neg. geladener Gefäß-Wand



$pH \leq 4$

H^+-Überschuß

$pH \geq 8$

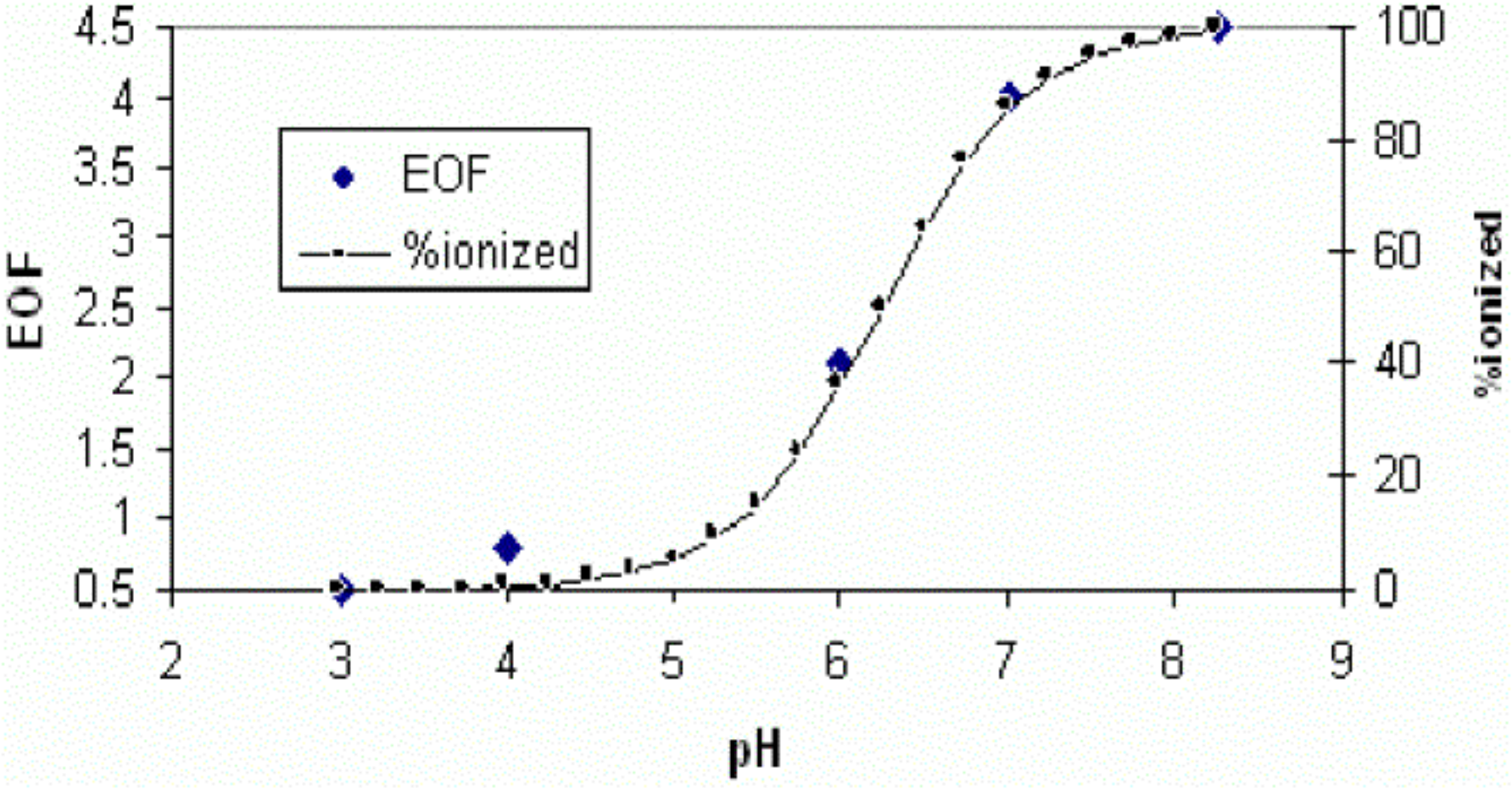
H^+-Mangel

$$SiOH \leftrightarrow SiO^- + H^+$$

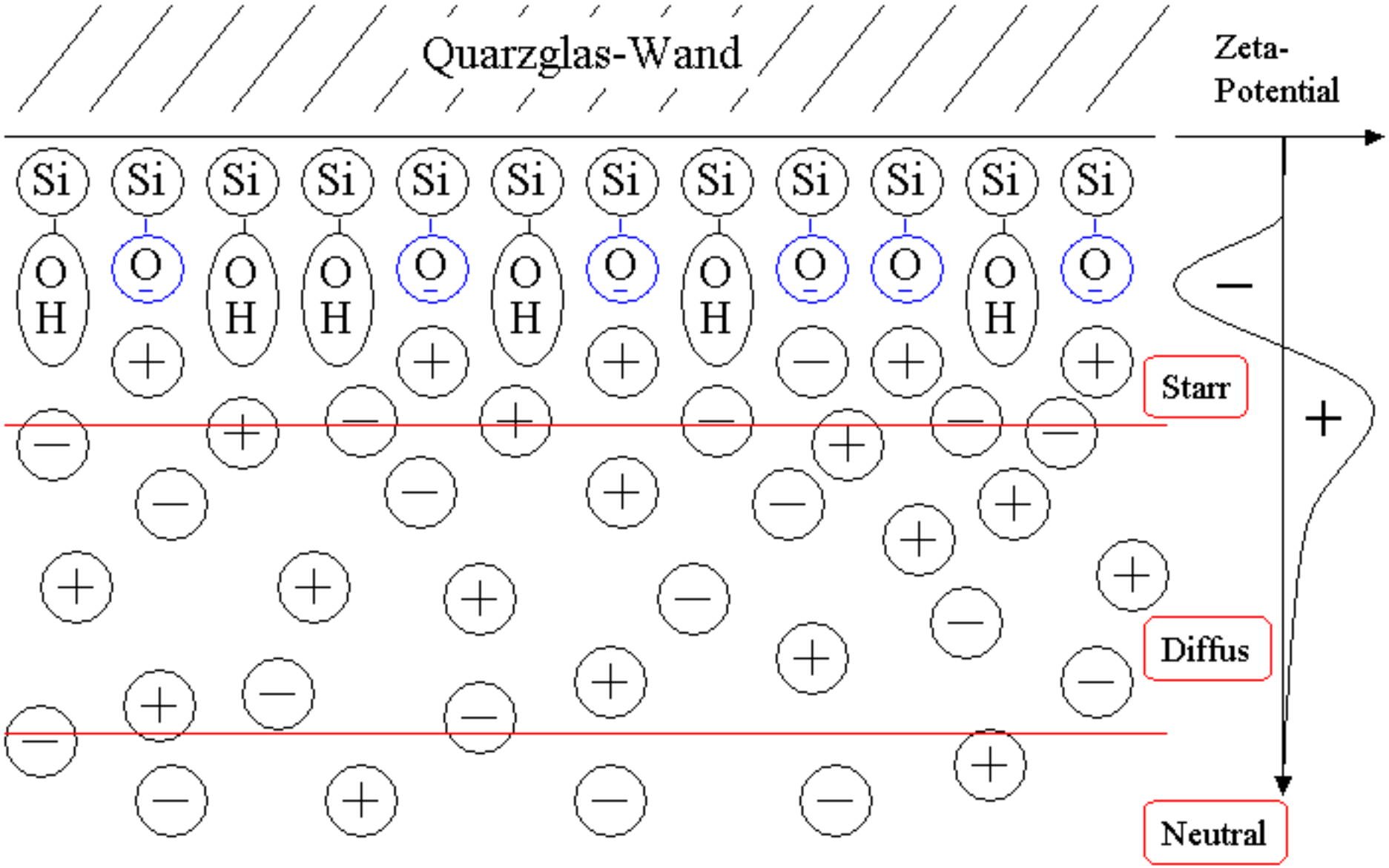
EOF an Quarzglas

pH-Abhängigkeit des Anteils ionisierter Silikatmoleküle

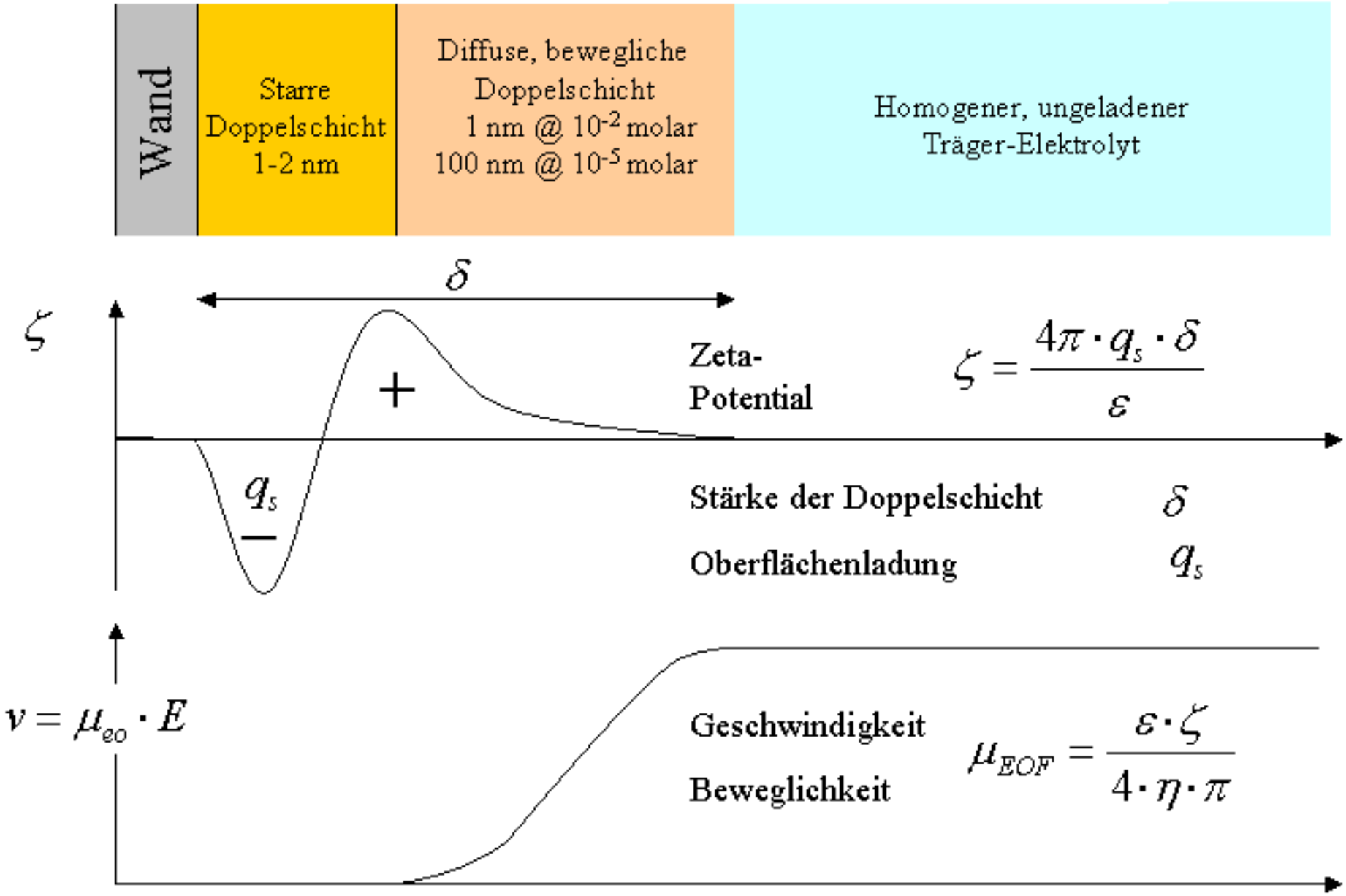
und resultierender EOF



Zeta-Potential an Gefäßwand

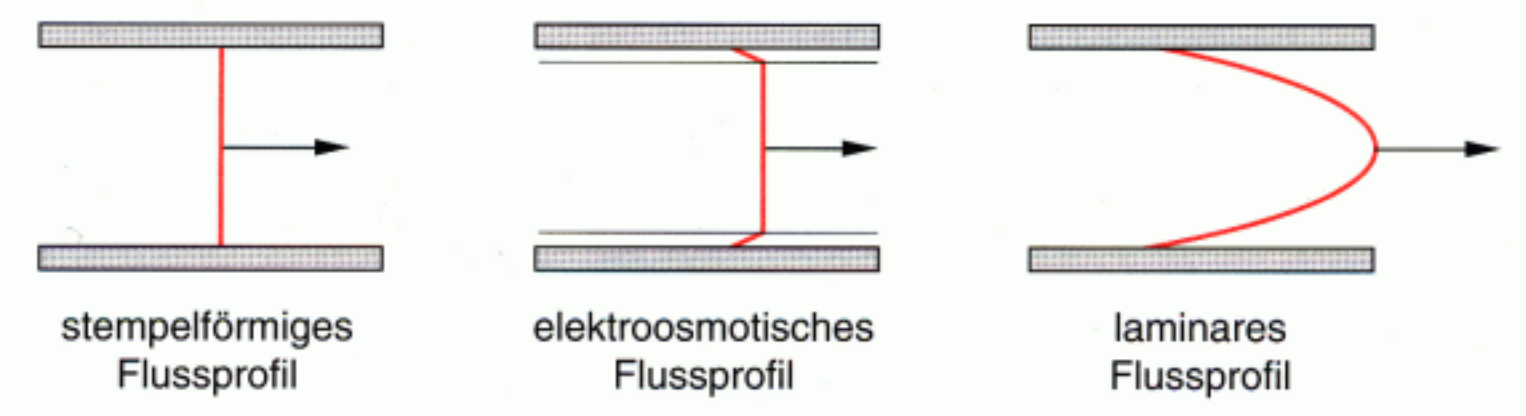


Bewegung des Träger-Elektrolyten, EOF



Geschwindigkeitsprofile

Unterschiedliche treibende Kraft der Ionen-Bewegung



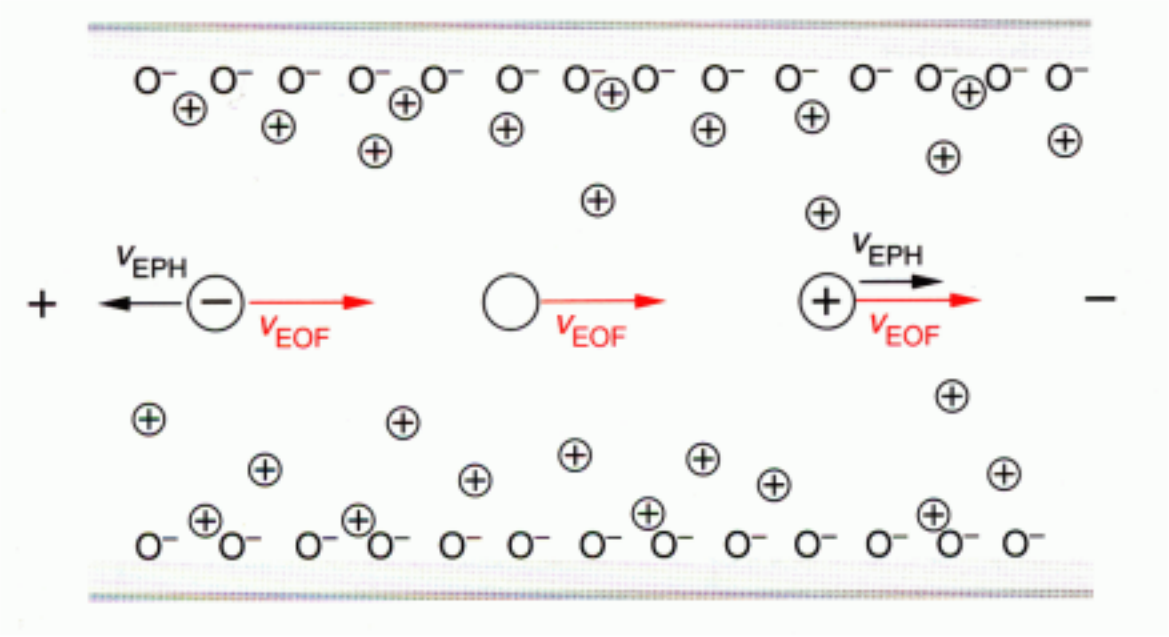
Bewegung von Ionen in einer Kapillare

Freier Elektrolyt in einer Kapillare mit EOF:

Überlagerung der Geschwindigkeiten der Ionen

Gemeinsame Bewegung $v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \eta \cdot \pi}$ typisch mm / min

Individuelle Bewegung $v_{EpH} = \mu_{EpH} \cdot E$ z.B. in Sieb-Matrix oder freiem Elektrolyt



Gesamt-Geschwindigkeit

$$v = E \cdot \left(\mu_{EpH} + \mu_{EOF} \right)$$

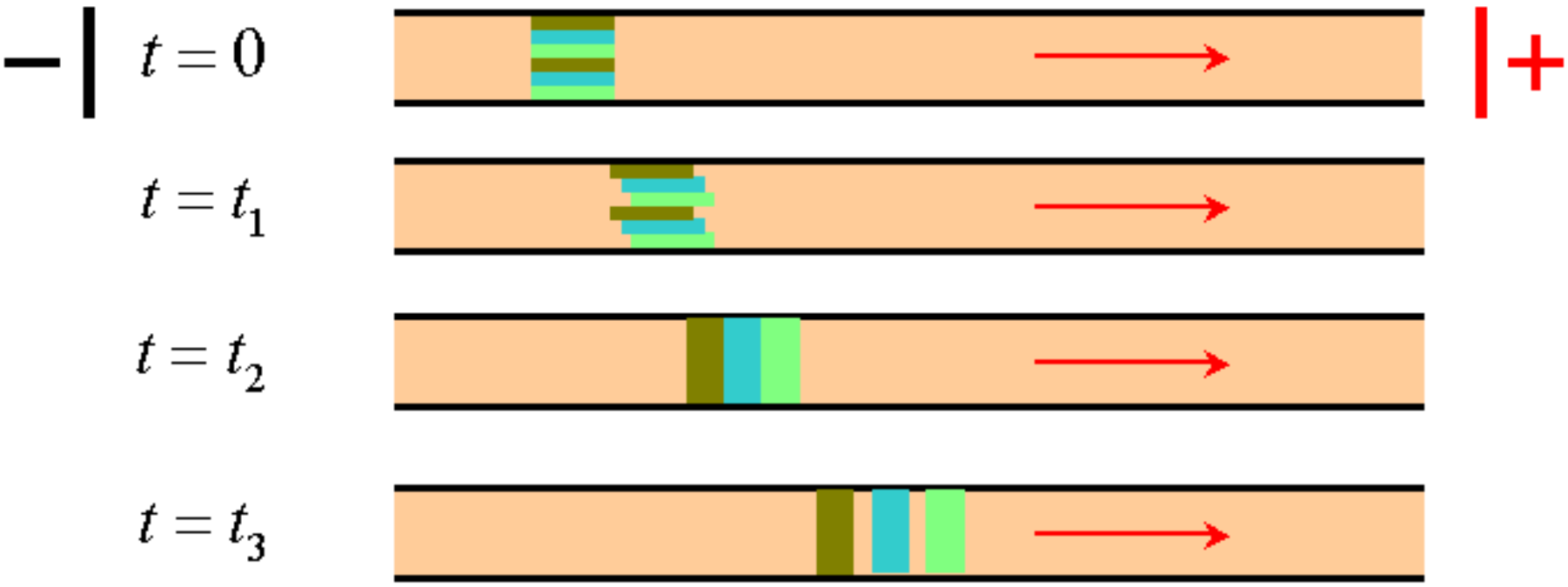
Alle Ionen in gleiche Richtung

Kapillarzonen-Elektrophorese, CZE

- Kapillare mit homogenem Träger-Elektrolyt
- Ionen unterschiedlicher Beweglichkeit driften immer weiter auseinander und behalten Geschwindigkeitsverhältnis bei
- Zunehmende Bandenverbreiterung, Keine Konzentrationssteigerung der Probe

Probe $\mu_A < \mu_B < \mu_C$

$$v_i \propto \mu_i$$



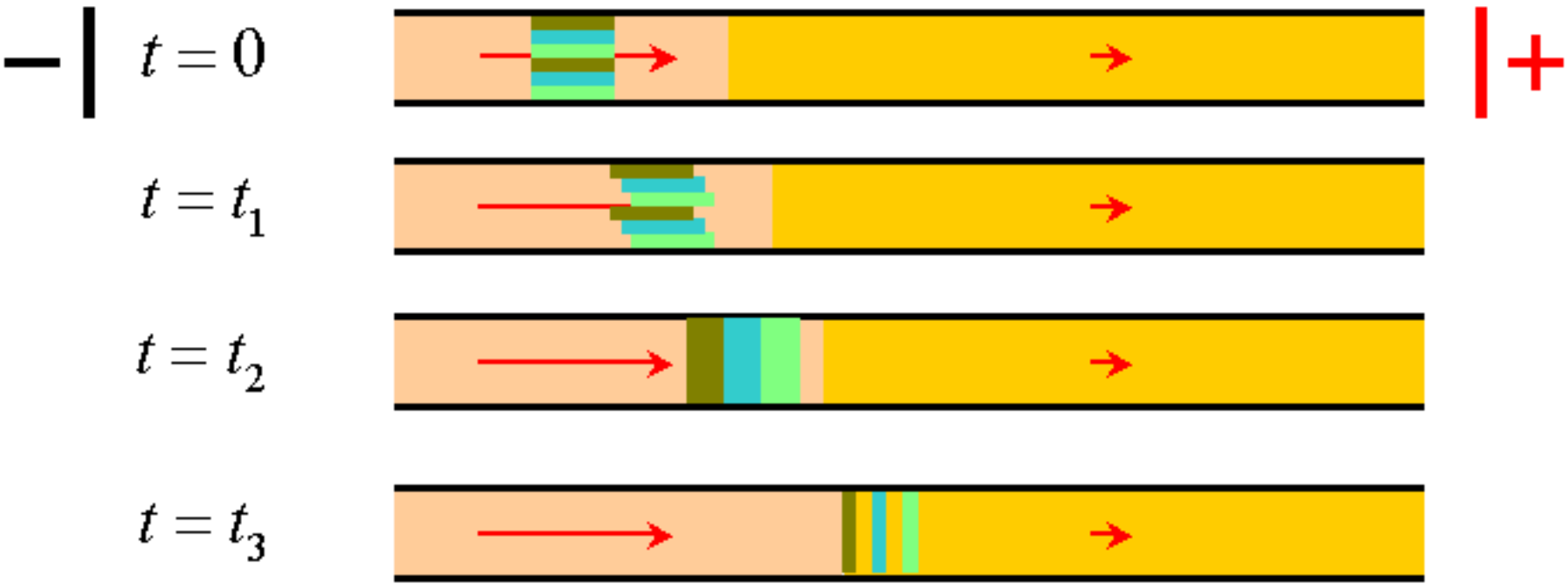
IsoTachoPhorese, ITP

- Kapillare mit Träger-Elektrolyt mit Leitfähigkeits-Sprung
- Die Ionen unterschiedlicher Beweglichkeit ordnen sich nahe der Grenzfläche in "Scheiben" an, die sich mit gleicher Geschwindigkeit bewegen
- Konzentrationssteigerung der Probe bis 100 fach

$$v_i = \frac{\mu_i}{c_i} \qquad \frac{\mu_A}{c_A} = \frac{\mu_B}{c_B} = \frac{\mu_C}{c_C}$$

Probe $\mu_A < \mu_B < \mu_C$

$c_1 < c_2$



Elektrophoretische Methoden - Zusammenfassung

SDS-PAGE	ITP Isotacho-phorese	CZE Zonenelektro-phorese	Pulsed Field Elektro-phorese	IEF	2D
Molekular-gewicht	Beweglichkeit	Beweglichkeit	Molekular-gewicht	Isoelektrischer Punkt	Isoelektrischer Punkt & Molekular-gewicht
PAA	Elektrolyt	Elektrolyt	Agarose	PAA	PAA & PAA
FlachGel	Kapillare	Kapillare	FlachGel	FlachGel	Gelstreifen & FlachGel
Proteine	Proteine	Proteine, DNA	Große DNA	Proteine	Proteine
Färbung, Antikörper	UV-Detektion	UV-Detektion	Färbung	Färbung	Färbung