

Elektrophorese – Wanderung durch das elektrische Feld

Bei **Elektrophoresen** macht man sich zu Nutze, dass wichtige Bio-Makromoleküle, wie Nukleinsäuren und Proteine, über geladene Gruppen verfügen. Im elektrischen Feld wandern Sie je nach ihrer Ladung durch ein Trägermaterial zur Anode (Pluspol) oder zur Kathode (Minuspole).

1.1 Welche geladenen Gruppen treten beispielsweise bei Proteinen auf?

Die **Wanderungsgeschwindigkeit** ist dabei proportional der **elektrischen Feldstärke** und der **Ionenladung**, und umgekehrt proportional dem **Teilchenradius r** und der **Viskosität** des Trennmediums.

Bei der **Gelelektrophorese** spielt auch das Verhältnis zwischen dem Teilchenradius und der Porenweite des Gels eine Rolle: Das Gel wirkt auf molekularer Ebene wie ein Sieb, so dass sich ein größerer Teilchenradius stärker hemmend auf die Wanderungsgeschwindigkeit auswirkt, als nur durch die Viskosität alleine zu erwarten wäre. Durch die unterschiedliche Ionenladung und den Teilchenradius bewegen sich die einzelnen Stoffe (Moleküle) unterschiedlich schnell durch das Trägermaterial.

Proteine werden meist in **Polyacrylamid-Gelen (PAG)** aufgetrennt, so dass man auch von der **Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)** spricht. Gele sind Medien, in denen Analytmoleküle nur eine sehr geringe Diffusion aufweisen. Sie gewährleisten die dadurch relativ scharfe Banden, die nicht durch Diffusionsvorgänge an den Rändern „auseinanderfransen“.

1. Isoelektrische Fokussierung

Prinzip

Bei der **isoelektrischen Fokussierung (IEF)** durchwandern die zu trennenden Komponenten ein Gel mit pH-Gradient. Es kommen nur solche Stoffe in Frage, die aus **Ampholyten** aufgebaut sind, also beispielsweise Peptide und Proteine. Die einzelnen Bestandteile besitzen unterschiedliche **isoelektrische Punkte (IEP, pI)**. Die Stoffe werden so lange durch das elektrische Feld transportiert, bis sie den pH-Wert im Gel erreichen, bei dem sie nach außen hin nicht mehr geladen sind, also ihrem IEP. Ab dieser Höhe hat das elektrische Feld keinen Einfluss mehr auf die Bande. Die Proteine werden an dem Ort mit dem pH-Wert aufkonzentriert (**fokussiert**), der ihrem IEP entspricht (vgl. Abb. 1.1). Da die Auftrennung alleine aufgrund der Ladung erfolgt, kann keine Aussage über die Molekülmassen der Proteine getroffen werden.

Zusätzlich werden zur Auswertung leicht zugängliche und gut aufzureinigende Referenzproteine (**Marker**) eingesetzt. Beispiele: Kuhmilch-Lactoglobuline: $pI = 2,2$ und $2,3$. Cytochrom C: $pI = 10,7$

Beachten Sie, dass die pH-Auflösung im Gel nicht überall gleich ist. Typischerweise ist sie im mittleren pH-Wert-Bereich der isoelektrische Punkt deutlich feiner aufgelöst.

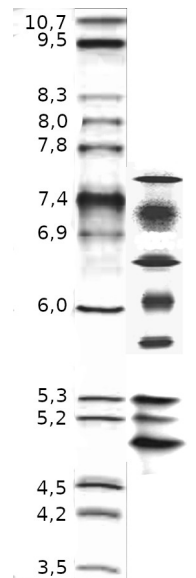


Abb. 1.1: Bsp. einer IEF q: eW

1.2 Abb. 1.1 (siehe rechts) zeigt das Ergebnis einer IEF. linke Spur: Marker. rechte Spur: Probe. Schätzen Sie die pI -Werte der Probebanden

Zeichnung (mit Lehrkraft)

Wie kommt der pH-Gradient in das Gel? Wie wird die Probe aufgetragen?

Zur Ausbildung des pH-Gradienten gibt es zwei Verfahren:

- a) **Immobilisierter pH-Gradient:** Bei der Gelherstellung werden die jeweils pH-erzeugenden Moleküle am passenden Ort fest (d.h. kovalent) in das Makromolekül-Netzwerk eingebaut. Die Molekülstruktur und die Zusammensetzung der eingebauten Komponenten ändern sich mit der Position im Gel graduell. Insgesamt entsteht deshalb ein pH-Gradient. Solche Gele mit fixiertem pH-Gradient werden fertig gekauft.
- a) **pH-Gradient über ein Trägerampholyt-Gemisch:** Neben den zu trennenden Ampholyten (*Probeampholyte*, z.B. Proteine, Peptide) beinhaltet die verwendete Pufferlösung auch komplexes **Trägerampholytgemisch** mit sehr vielen Komponenten (**Trägerampholyte**). Solche Trägerampholytgemische (z.B. BioLyte®) spannen unterschiedliche pH-Bereiche auf. So gibt es Trägerampholytgemische mit einem Gradient zwischen pH= 7-8, andere sind breiter angelegt und spannen einen Bereich zwischen pH = 3 -10 auf.

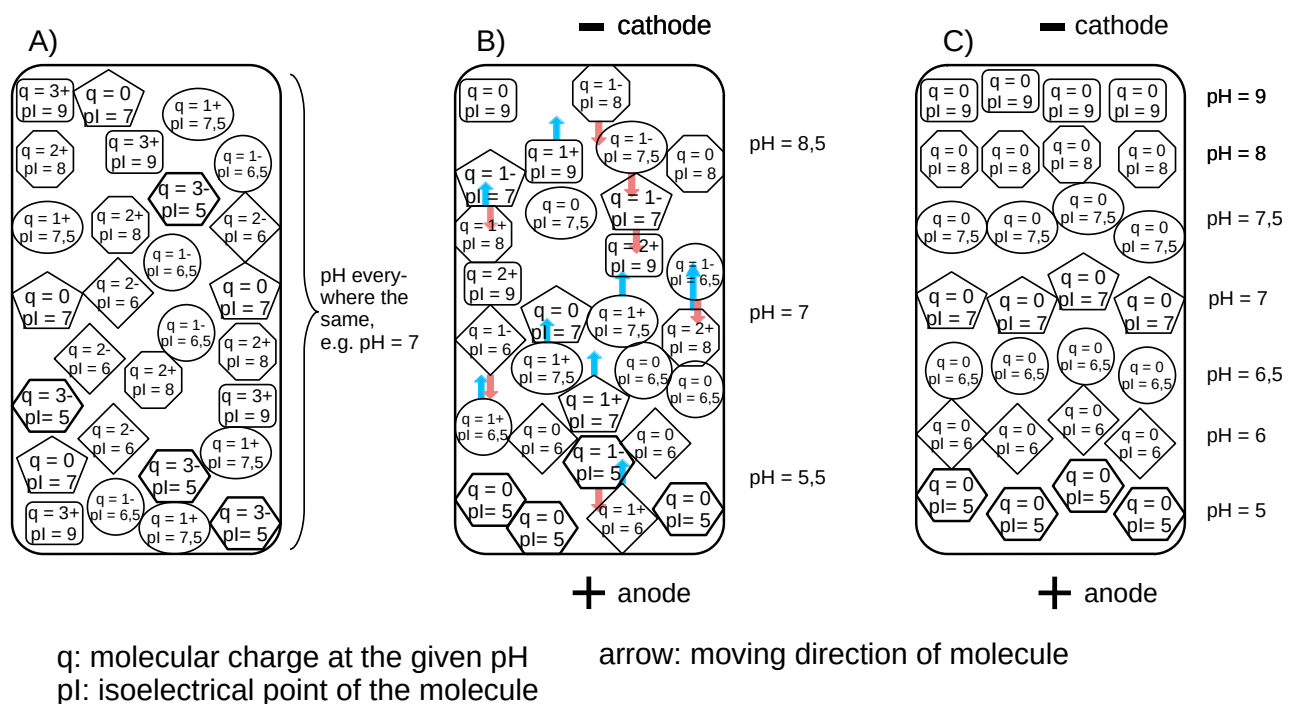


Abb. 1.2: Prinzip der Entstehung des pH-Gradienten mit einem Trägerampholytgemisch (Q: eW)

Zu A. Ohne angelegtes Feld sind die Ampholytmoleküle ungeordnet im Gel. Überall im Gel ist der pH-Wert identisch (z.B. pH = 7). Die Moleküle, die einen höheren isoelektrischen Punkt (pI) als der pH-Wert der Flüssigkeit besitzen, sind positiv geladen ($q > 0$). Diejenigen Ampholytmoleküle, deren pI kleiner als der umgebende pH-Wert ist, besitzen eine negative Ladung ($q < 0$). Je größer der Unterschied zwischen pI und dem pH-Wert, desto höher ist der Betrag der Ladung.

Zu B. Legt man eine Spannung an, so werden positiv geladene Moleküle zur (-)-Pol (Kathode) und negativ geladene Moleküle zur (+)-Pol (Anode) gezogen. Es kommt zu einer Sortierung der Ampholytmoleküle nach ihrem pI . Am Ort der Aufkonzentration sorgen sie auch für einen pH-Wert, der ihrem pI -Wert entspricht. Dadurch beeinflussen die Trägerampholyte auch die Molekülladung anderer Trägerampholytmoleküle. Insgesamt beginnt sich ein pH-Gradient auszubilden.

Zu C. Die Moleküle konzentrieren sich dort auf, wo der pH-Wert ihrem pI entspricht. Dort sind sie dann nicht mehr geladen ($q = 0$). Insgesamt entsteht so ein sich selbst stabilisierender pH-Gradient. Diffundiert ein Molekül weg, so liegt es wieder geladen vor und wird durch den Strom zurück transportiert.

Ein größeres Problem liegt in der Praxis darin, den pH-Gradienten stabil zu halten. So können Trägerampholytmoleküle im Lauf der Trennung zur Kathode hin abdriften, so dass z.B. der pH-Gradient zu Beginn den Bereich pH = 5,3 – 9,5 aufspannt, am Ende jedoch bei pH = 6,1 – 9,5. Insgesamt ist die Auflösung von Gelen mit kovalent gebundenen Ampholyten (immobilisierter pH-Gradient) deutlich größer als bei mobilem pH-Gradient.

2. SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen

Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt, dass Proteine ihre Quartär- und Tertiärstrukturen verlieren, ein Vorgang der als **Denaturierung** bezeichnet wird. Die räumliche Struktur der Proteine, die durch Bindungen der Aminosäurereste zustande kommt, wird durch das SDS zerstört. Die Proteine werden linearisiert. SDS lagert sich dabei an die Proteinmoleküle und bewirkt, dass die individuellen Ladungsunterschiede nivelliert werden: Als anionisches Molekül „überdeckt“ das Dodecylsulfat-Ion mit seiner negativen Ladung die Eigenladung der Proteine. Das Verhältnis Ladung zu Masse ist für die Proteine konstant. Pro Gramm Protein werden ca. 1,4 g SDS angelagert.

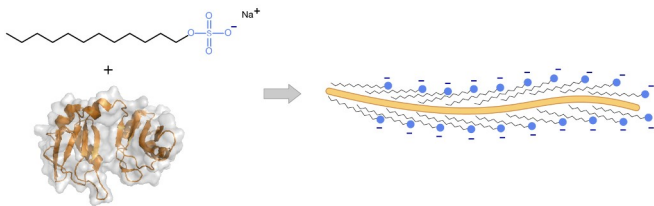


Abb. 2.1: Eigenschaften von SDS (Q: wikicommons; A: Fdardel)

Zur Behandlung wird die Proteinlösung einige Zeit mit SDS-haltigem Puffer in der Wärme inkubiert.

Um Disulfidgruppen zwischen Aminosäureresten aufzubrechen können noch zusätzliche Reagenzien eingesetzt werden. Dazu gehören das übel riechende **Mercaptoethanol (HS-CH₂-CH₂-OH)** oder das nicht ganz so stinkende **Dithiothreitol (DTT)**.

Die anschließende Trennwirkung der Elektrophorese beruht ausschließlich auf Größenunterschiede und nicht auf Ladungsunterschiede oder Unterschiede in der räumlichen Form der Proteine! Die SDS-Protein-Assoziante wandern während der Elektrophorese durch das Gel zur Anode.

Das Polyacrylamid-Gel

Bei der SDS-Page wird ein **Polyacrylamid-Polymer** als Gel benutzt. Bei der Herstellung des Gels werden die Monomere **Acrylamid** und **Methylenbisacrylamid** (kurz auch **Bisacrylamid** genannt) zu ein dreidimensionalen Netzwerk verbunden (Polymerisation). Um diese Polymerisation bei Raumtemperatur zu ermöglichen, wird noch der **Polymerisationskatalysator TEMED** (Tetramethylethyldiamin), zugegeben. Als **Starter der Polymerisation** wird gewöhnlich Ammoniumperoxodisulfat (**APS**) eingesetzt. Das Peroxodisulfat-Ion neigt zum Zerfall in 2 Radikale: $[O_3S-O-O-SO_3]^{2-} \rightarrow 2 [O_3S-O\cdot]^-$. An das Radikal kann sich ein Molekül mit einer C=C-Doppelbindung anlagern, wobei wieder ein Radikal entsteht, an das eine weitere Anlagerung möglich ist. Durch die fortgesetzten Kettenverlängerung, verknüpfen sich die Monomere zu einem 3D-Netzwerk, es handelt sich also um eine **radikalische Polymerisation**.

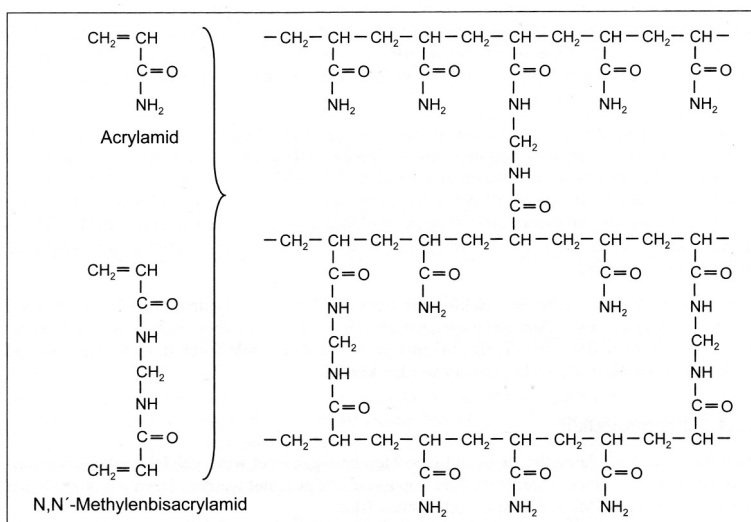


Abb. 2.2: Struktur eines Polyacrylamidgels

2.2 Markieren Sie im Netzwerkausschnitt den Strukturteil der auf...

a) ...ein Acrylamid-Molekül...

b) ... ein Methylenbisacrylamid-Molekül
(crosslinker) ...zurückzuführen ist.

2.3. Bei einem großen Chemikalien-Anbieter gibt es folgende Gelmischungen zu kaufen.

Angaben in Konz.%, (Acrylamid : Bisacrylamid)

* Elektrophorese Gel 40% (37,5 : 1) [Standard] und

* Elektrophorese Gel 40% (29 : 1)

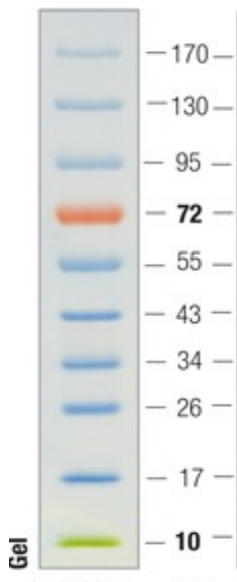
Welches der beiden Gele ist engmaschiger?

Die zum Polyacrylamid sollte unter weitgehendem Luftabschluss erfolgen. Deshalb wird das Gel normalerweise zwischen zwei Glasplatten gegossen und dadurch der Luftzutritt verhindert. Diese Vorgehensweise ist der Hauptgrund, warum die SDS-PAGE hauptsächlich mithilfe vertikaler Trennkammern erfolgt. Die Probe wird in Aussparungen des Gels („Taschen“) die zwischen den Glasplatten hineinragen von oben mit speziellen Pipettenspitzen eingebracht.

Je höher der Gehalt an Monomeren, desto engmaschiger wird das Gitter. Das Gel wirkt wie ein Sieb: Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern. Will man diesen Siebeffekt ausschließen, z.B. bei der Isoelektrischen Fokussierung, bei der die Trennung nur nach dem isoelektrischen Punkt erfolgen soll, wählt man eine große Porenweite.

Am Ende des Vorganges sind alle Proteine nach Größe sortiert. Zusätzlich zu den Proben wird meistens ein **Größenmarker („Proteinleiter“)** auf das Gel geladen. Dieser besteht aus Proteinen mit bekannter Größe und ermöglicht dadurch die Abschätzung der Größe von Proteinen in den eigentlichen Proben (siehe Abb. 2.2). Zwischen der Wanderstrecke und dem Logarithmus (!) des Molekulargewichtes des Proteins gibt es einen linearen Zusammenhang.

2.4 Erklären Sie, an welchem Ende des Markers in Abb. 2.2 die Anode und an welchem Ende die Kathode angelegt war. Kennzeichnen Sie im Gel den Startpunkt der Elektrophorese.



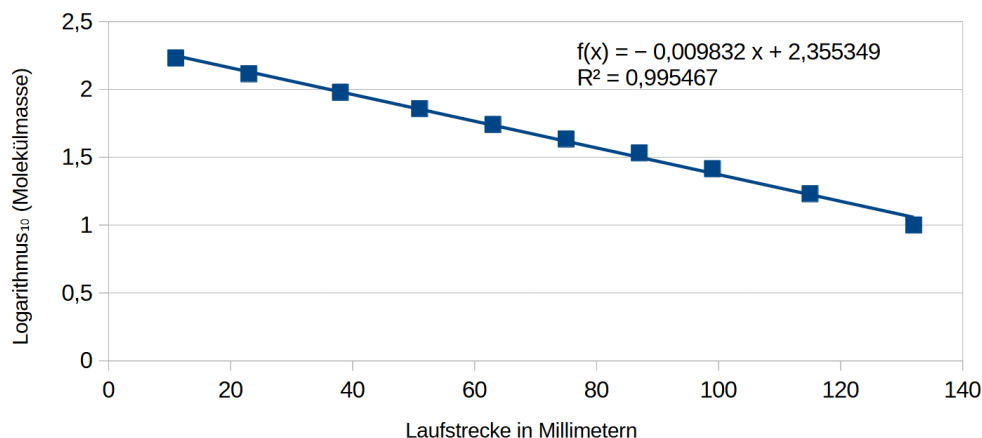
2.5 Vervollständigen Sie die Laufstrecke und die dazugehörige Molekülmasse (in kDa).

Laufstrecke [mm]	lg M (M in kDa)	Laufstrecke [mm]	lg M (M in kDa)
11	lg 170 =	75	lg 43 =
23	lg 130 =	88	lg 34 =
38	lg 95 =	98	lg 26 =
51	lg 72 =	116	lg 17 =
63	lg 55 =	132	lg 10 =

Abb. 2.2: Proteinleiter

Praktikum

2.6 Eine unbekannte Säugetierprotein wandert 57 mm weit. Berechnen Sie die ungefähre Molekülmasse in g/mol und die ungefähre Anzahl an Aminosäuren im Protein. Hinweis: Bei einem Säugetier nimmt man als durchschnittliche molare Masse 110 Da (110 g/mol) an.



Diskontinuierliche Gelelektrophoresen am Bsp. der **diskontinuierlichen SDS-PAGE**

Vor dem Eintritt in die eigentlichen Trennzone wird das Proteingemisch bei der **diskontinuierlichen SDS-PAGE** elektrophoretisch durch ein **Sammelgel** gezogen. Im Sammelgel bilden die Proteine einen kompakten Stapel aus, der das Gel durchwandert. Die einzelnen Proteinsorten besitzen eine bestimmte Position in diesem Stapel. Alle Sorten wandern gleich schnell, eine auftrennende Wirkung ist im Sammelgel nicht gegeben. Dadurch tritt das Gemisch als scharfe Bande in das Trenngel ein.

Für die Bildung des kompakten Stapels sind zwei Sachverhalte verantwortlich

- Im Sammelgel-Puffer liegen Chloridionen vor, die eine relativ große Ionenbeweglichkeit besitzen, man spricht deshalb auch von **Leitonen**. Weiterhin befindet sich im Puffer auch die Aminosäure Glycin, die aufgrund des pH-Wertes des Sammelgels ($\text{pH} = 6,8$) hauptsächlich als Zwitterion vorliegt. Nach außen hin ist Glycin also ungeladen und seine Wanderungsgeschwindigkeit entsprechend gering, man spricht auch von **Folgeionen**. Im elektrischen Feld des Sammelgels wandern die Leitonen schneller als die Folgeionen. Zwischen diesen beiden Fraktionen baut sich ein zusätzlicher Spannungsgradient auf, hier sortieren sich die Proteine zu einem Stapel. Jede Proteinsorte hat eine bestimmte Position im Stapel. An der Grenze zum Trenngel ändert sich der pH-Wert, so dass die Glycin-Ionen ihre Wanderungsgeschwindigkeit erhöhen, weil sie jetzt im Schnitt stärker geladen sind. Sie laufen von hinten auf die Proteine auf und beschleunigen die hinteren Fraktionen. Insgesamt treten alle Proteine deshalb als scharfe Bande in das Trenngel ein. Analogie: *"Eine Menschenschlange bewegt sich auf ein offenes Tor ($\hat{=}$ Grenze zwischen den Gelen) zu. Alle Personen ($\hat{=}$ Proteinsorten) laufen hintereinander mit der gleichen Geschwindigkeit. Durch das Tor tretend, schubst die letzte Person ($\hat{=}$ Folgeionen) von hinten die Menschenschlange, so dass diejenigen, die in der Schlange hinten positioniert sind, beschleunigt werden. Unmittelbar nach dem Tor sind dann alle auf Menschen auf gleicher Höhe und nun beginnt jeder hier mit unterschiedlichem Tempo zu laufen".*
- Im Sammelgel wird eine große Porenweite gewählt, die die Wanderungsgeschwindigkeit aller Proteine noch zusätzlich erhöht. Individuelle Unterschiede in der Wandergeschwindigkeit, die für eine Auftrennung verantwortlich wäre, werden so bis zu einem gewissen Grad nivelliert.

Möglichkeiten der Weiterverarbeitung des Gels

Möglichkeit A: Färbung

Die aufgetrennten Proteine können durch verschiedene Verfahren sichtbar gemacht werden. Das wichtigste Verfahren ist hierbei die Färbung mit *Coomassie Brilliant-Blau (CBB)*, sowohl CBB-R250 als auch CBB-G-250 (**chemisch nicht identisch. Achtung: Verwechslungsgefahr!**). Dazu wird das Gel in eine Wanne mit der Färbelösung gelegt.

Möglichkeit B: Proteine wieder in Lösung bringen

Die aufgetrennten Proteine können aus einem ausgeschnittenen Gelstück wieder herausgelöst werden. Oft bedient man sich dabei der **Elektroelution**:

Ein Gelstück mit dem interessierenden Protein wird dabei in ein inneres Elutionsgefäß gegeben, dass selbst in ein größeres Reaktionsgefäß taucht. Über eine kleine Öffnung können dann bei Anlegung von Spannung die eluierten Proteine in den Puffer des Reaktionsgefäßes gelangen (vgl. Abb. rechts). (Lottspeich 2006). Statt Bisacrylamid können bei der Gelherstellung auch andere *crosslinker* (z.B. N,N'-(1,2-Dihydroxyethyl)-bisacrylamid eingesetzt) eingesetzt werden. Diese ermöglichen es, Gelstreifen mit der interessierenden Proteinbande mit Chemikalien wieder aufzulösen (Pingoud und Urbanke 1997). Auch existieren **Gel-extraktionsmethoden**, bei der das beladene Gelstück mit Ultraschall behandelt wird, wodurch die Proteine in den umgebenden Puffer wechseln. Für all diese Verfahren sind spezielle Kits im Handel erhältlich.

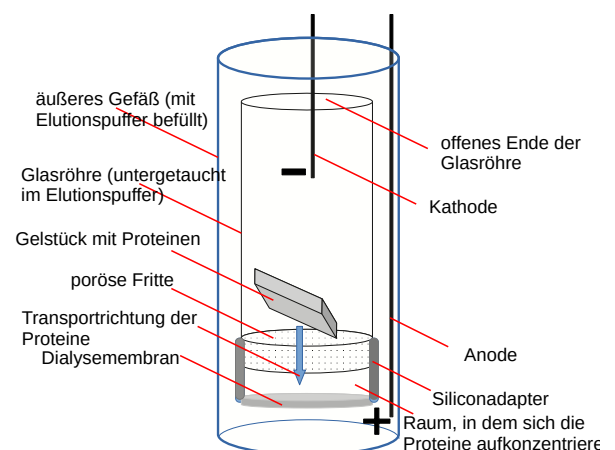


Abb. 2.4: Funktionsweise der Elektroelution Q: ew

1.3. Erklären Sie die Polung bei der Elektroelution.