



**Wissen kompakt:
Proteinelektrophorese**

Flexibel. Verlässlich. Persönlich.

Elektrophoresetechniken

1. Zonenelektrophorese
2. Isotachophorese
3. Diskelektrophorese
4. SDS PAGE
5. Isoelektrische Fokussierung
 - 5.1 Prinzip
 - 5.2 Ampholyte
 - 5.3 Immobilisierte pH-Gradienten
6. 2D Elektrophorese

„Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld.“

Bioanalytik, Teil 1, Kapitel 12

Die einfache Aussage in dem Methodenbuch von Friedrich Lottspeich und Joachim W. Engels, verfasst von Reiner Westermeier, lässt nicht sofort ahnen, dass die Elektrophorese sicher die vielseitigste aller Bioanalytikmethoden und auch die weltweit am häufigsten eingesetzte Trenntechnik für Biomoleküle ist. Geschätzte 80 % aller „Life Science“-Wissenschaftler weltweit bedienen sich der Elektrophorese in einer ihrer mannigfaltigen Applikationen und Techniken. In dieser kurzen Übersicht wird die Elektrophorese von Proteinen im Fokus stehen, auch wenn in der Bioanalytik die Elektrophorese von DNA und RNA von ähnlicher Bedeutung ist.

Prinzip der Elektrophorese

In einem elektrischen Feld wandern gelöste oder kolloidale Moleküle oder Partikel entsprechend ihrer Ladung. Positiv geladene Teilchen (Kationen) wandern zur negativen Kathode, negativ geladene Teilchen (Anionen) wandern zur positiv geladenen Anode. Bei der Proteinelektrophorese befinden sich die zu trennenden Moleküle in der Regel in einer wässrigen Pufferlösung, bei der auch die Pufferionen zu ihren der Ladung entsprechenden Elektroden wandern.

Die Wanderungsgeschwindigkeit oder besser die „elektrophoretische Mobilität“ hängt von einer Reihe von Parametern ab: Vom pKs Wert, der Stoffkonstante, die angibt wie stark ein Molekül in wässriger Lösung protoniert wird; von der Art der Konzentration, von der Temperatur und dem pH-Wert des Puffers sowie von der elektrischen Feldstärke des angelegten Stroms. Da Elektrophoresen in den meisten Fällen in Gelen durchgeführt werden, hängt die Mobilität zusätzlich von der Beschaffenheit des Gelmaterials ab.

Eine beachtliche Reihe von Einflussfaktoren, die eine reproduzierbare Elektrophorese nur erlauben, wenn alle Faktoren möglichst gut kontrollierbar sind und nur die variieren, die zur Optimierung der elektrophoretischen Trennung beitragen.

Es lassen sich drei Gruppen von Elektrophorese-Techniken unterscheiden, die grundlegende Unterschiede in der Trennmethode aufweisen:

- die Zonenelektrophorese
- die Isotachophorese ITP
- die Isoelektrische Fokussierung IEF

1. Zonenelektrophorese

Bei der Zonenelektrophorese werden die Proteine nach ihrer elektrophoretischen Mobilität getrennt. Die einzigen konstanten Parameter sind die Konzentration und der pH-Wert des Puffers sowie die Konzentration und Geometrie des Gels. Das Puffersystem ist homogen, das bedeutet der pH-Wert über die gesamte Trennstrecke gleich. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine wird bestimmt durch die Ladung, Größe und Quartär- und Tertiär-Struktur des Proteins. Die Elektrophorese wird dabei nach einer bestimmten Zeit abgebrochen, meist wenn die Pufferfront das Gel-Ende erreicht hat.

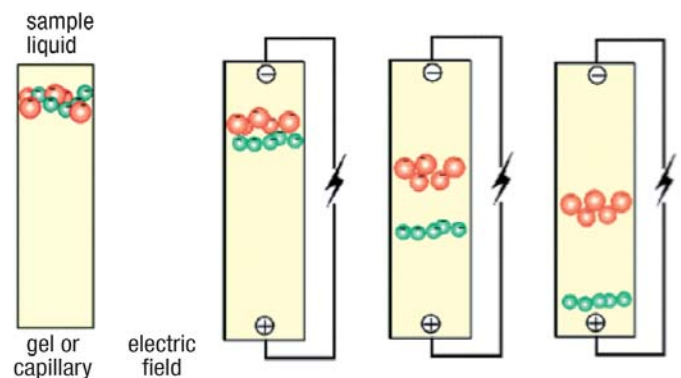


Abb. 1: Bei der Zonenelektrophorese werden die Proteine entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität aufgetrennt, die - das Protein betreffend - von seiner Nettoladung, Molekülgröße und Form abhängig ist.

2. Isotachophorese

Bei der Isotachophorese (ITP), auch Gleichgeschwindigkeitselektrophorese, wird die Trennung in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Die ionisierten Probensubstanzen wandern zwischen einem „schnellen“ Leit-ion (L) und einem „langsamen“ Folge-ion (T, eng. Trailing, folgen, nachlaufen) mit gleicher Geschwindigkeit (siehe Abb. 2). Dabei sortieren sich die verschiedenen Probenkomponenten entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität zwischen der höchsten Mobilität des Leit-Ions und der niedrigsten des Folge-Ions. Die Konzentration der einzelnen Proteinfractionen entspricht der Konzentration des Leit-ion-Puffers. Der Effekt der Isotachophorese wird bei der Diskelektrophorese und der SDS PAGE genutzt.

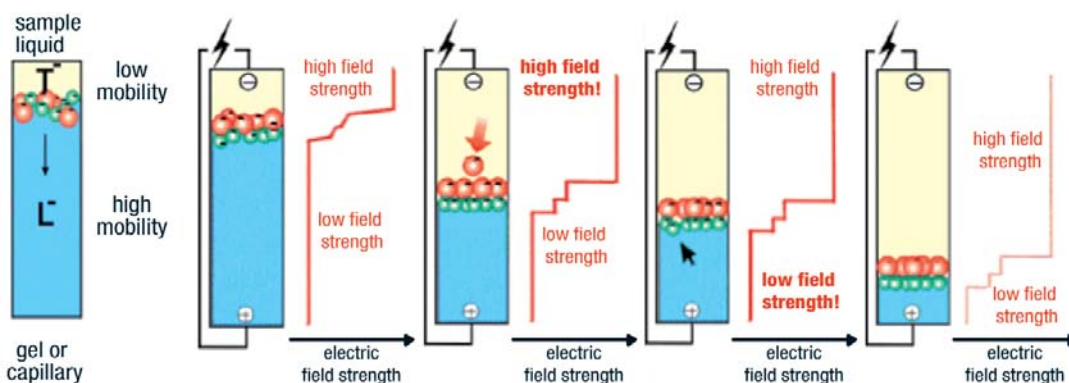


Abb. 2: Bei der Isotachophorese laufen alle geladenen Moleküle sowie die Leit- und Folge-Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit. Wegen der Feldstärkenunterschiede aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten bilden sich scharfe Zonentrennlagen aus und die einzelnen Zonen werden alle auf die Konzentration des Leit-Ions eingestellt.

3. Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese nach Ornstein und Davies verbindet die Prinzipien der Zonelektrophorese mit der Isotachophorese und löst damit bei der Auftrennung von Proteinen in Gelen zwei Probleme auf einmal: Sie verhindert das Aggregieren und Präzipitieren von Proteinen beim Eintritt in die Gelmatrix und erzeugt eine hohe Bandenschärfe. Die Diskontinuität bezieht sich auf vier Parameter:

- Gelstruktur
- pH-Wert der Puffer
- Ionenstärke der Puffer
- Art der Ionen im Gel- und im Elektrodenpuffer

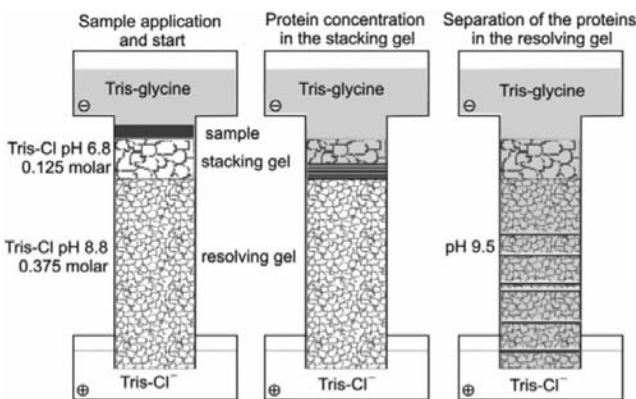


Abb. 3: Das diskontinuierliche Prinzip der Diskelektrophorese in den drei Schritten: 1. Das Gelsystem mit aufgegebenener Probe vor dem Einschalten des Stroms, 2. der Phase des Sammelgeleffekts (ITP) und 3. der anschließenden Zonengelelektrophorese.

Die Gelmatrix ist in zwei Bereiche eingeteilt: das Trenngel und das Sammelgel. Das engporigere Trenngel enthält 0,375 mol / L Tris-HCl-Puffer mit einem pH von 8,8, das großporigere Sammelgel enthält 0,1245 mol / L Tris-HCl-Puffer mit pH 6,8. Im Elektroden- (Lauf-)Puffer ist Tris-Glyzin mit einem pH-Wert von ca. 8,4 bis 8,9 (je nach Tris und Glyzin Qualität). Wenn nun das Glyzin-Ion in das Sammelgel läuft, verliert es fast seine gesamte Mobilität. Bei dem pH-Wert von 6,8 ist das Glyzin kaum dissoziiert und die elektrophoretische Mobilität sehr niedrig. Das Glyzin wird zum Folge-Ion und zwischen dem hochmobilen Chlorid-Ion und dem Glyzin stapeln sich die Proteinfractionen entsprechend ihrer Mobilität und konzentrieren sich auf die Pufferkonzentration.

Den Vorgang nennt man auch den „Stacking“-Effekt (engl. Aufstapeln). Im großporigen Sammelgel hat das Gel keinen restriktiven Effekt auf die Fractionen, die Trennung erfolgt rein nach der Ladung der Proteine. Der Proteinestapel bewegt sich langsam, mit der Geschwindigkeit der kaum geladenen Glyzin Moleküle in Richtung Anode bis das Trenngel erreicht wird. Hier kommt es wegen der niedrigeren Porengröße zu Reibungen zwischen der Gelmatrix und den Proteinen, was zu einer weiteren Bandenschärfung führt.

Anschließend kommt das Glyzin in den Bereich des pH 8,8 gepufferten Gels. Die Carboxyl-Gruppe des Glyzins dissoziiert und die relativ kleine Aminosäure wird sofort wesentlich beweglicher als die vor ihr „aufgestapelten“ Proteine, welche das Glyzin sofort überholt. Im Trenngel steigt der pH-Wert wegen des dissoziierten Glyzins auf pH 9,5. Damit sind die Proteine stärker geladen und wandern im Trenngel mit höherer Geschwindigkeit. Hier beginnt die Zonelektrophorese der Proteine, die sich dann wieder nach Ladung, Größe und Struktur auftrennen. Dabei ist die Startzone für jedes Protein sehr scharf und die Fractionen sind ja bereits aufgetrennt. In der Zonelektrophorese mit Sammelgel erhält man so wesentlich schärfere, höher konzentrierte Banden als in der einfachen Zonelektrophorese.

Diese „native“ Elektrophorese bringt jedoch auch ein Problem mit sich: Proteine mit einem isoelektrischen Punkt > 6,8 werden mit diesem Puffersystem nicht aufgetrennt. Dafür werden anderen Systeme benötigt. Eine Alternative ist die Verwendung von SDS (engl. sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat).

4. SDS PAGE

Die meistzitierte naturwissenschaftliche Veröffentlichung eines einzelnen Autors ist: Lämmli (August 1970): "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4".

Nature 227 (5259): 680–685. doi:10.1038/227680a0. PMID 5432063. In der Veröffentlichung beschreibt Prof. Ullrich Karl Lämmli die Kombination der von Shapiro 1967 eingeführten SDS-Elektrophorese mit der Diskelektrophorese nach Ornstein und Davies.

Bei der SDS-Elektrophorese werden die Proteine mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat denaturiert. Das SDS wirkt wie jede Seife, mit einem hydrophilen „Kopf“ und einer hydrophoben Kohlenwasserstoffkette (12 C-Atome):

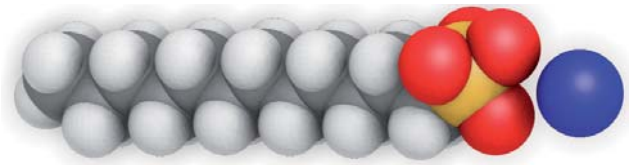


Abb. 4: Schematische Darstellung des SDS Moleküls ("Dodecylsulfate-3D-vdW". Licensed under Public domain via Wikimedia Commons.)

Das SDS bewirkt, dass die Proteine ihre Quartär- und Tertiär-Struktur durch Auflösung der Wasserstoffbrücken verlieren und sich nur durch die Länge ihrer Polypeptidketten unterscheiden. Die „Waschaktivität“ des Detergenzes entsteht dadurch, dass sich die hydrophoben KW-Ketten an die Aminosäurekette anlagern und sich die hydrophilen, negativ geladenen „Köpfe“ nach außen zum wässrigen Puffer hin ausrichten und Mizell-ähnliche Strukturen bilden.

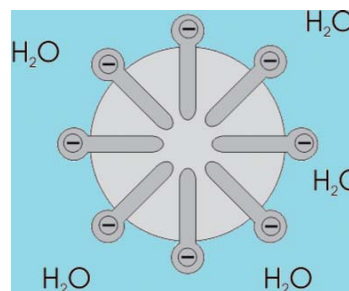


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Seifen Mizelle (wikipedia.org)

Durch die Beladung der Polypeptidkette mit dem anionischen Detergenz werden die Eigenladungen der Proteine vollständig überlagert. Es entstehen anionische Mizellen mit einer konstanten Nettoladung pro Masseinheit. 1,4 g SDS lagern sich an ca. 1 g Protein an. Die Mobilitätsparameter Ladung und Struktur (Form) des Proteins fallen weg. Proteine werden nur noch nach ihrer Größe getrennt.

Schwefelbrücken, die zwischen den Cysteinen gebildet werden, können durch Zugabe reduzierender Thiolverbindungen, wie 2-Mercaptoethanol, DTT (Dithiothreitol) oder ähnlichen Reagenzien, aufgespalten werden. Sehr häufig schützt man die SH-Gruppe durch eine darauffolgende Alkylierung mit z. B. Iodacetamid.

Die mit SDS beladenen, gestreckten Aminosäureketten bilden Ellipsoide mit etwa gleich langen Mittelabständen. Dadurch ergibt sich bei der Trennung eine lineare Beziehung zwischen der Proteingröße und der Wanderungsstrecke im Gel.

Gerätebeispiel und Fertiggele

Für die verschiedenen Elektrophorese-Techniken haben viele Anbieter Vertikalkammern in ihrem Angebot. Als Beispiel wird hier die BlueVertical™ PRIME™ vorgestellt.



Abb. 6: BlueVertical PRIME

Die BlueVertical PRIME ist eine kleine Vertikalkammer mit zwei Puffertanks für die diskontinuierliche Elektrophorese, die mit einem oder zwei Gelen gleichzeitig benutzt werden kann. Die Gele werden mit einer Klemmechanik in den inneren Einsatz eingespannt. Der Puffer im Einsatz-Innern ist der Kathodenpuffer, der Puffer im umgebenden äußeren Tank der Anodenpuffer.

Hier ein Beispiel für ein modernes Mini-Vertikal Gel mit einem 4-20 % Porengradienten. Das Gel hat eine lange Lagerstabilität und trennt dennoch nach dem klassischen Lämmli-Puffer Prinzip:

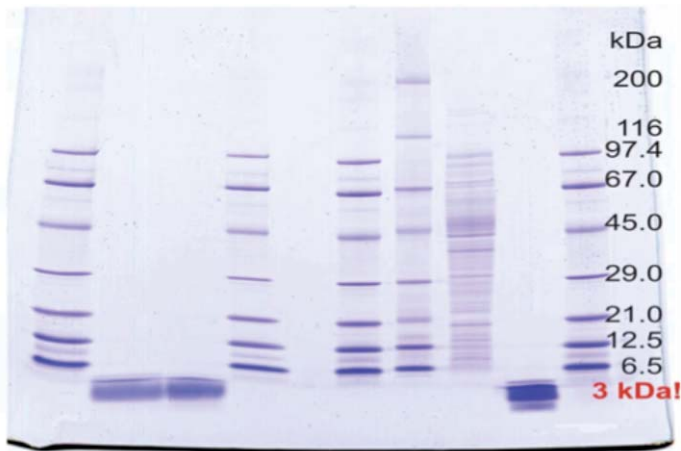


Abb. 7: SERVA Gel™ TG PRIME Gradient 4-20: Auffällig ist der extrem weite Trennbereich von >200 kDa bis unter 3 kDa.

5. Isoelektrische Fokussierung

5.1 Prinzip

Mittels der Isoelektrischen Fokussierung lassen sich Biomoleküle separieren, da sie aufgrund ihres Molekülaufbaus positive oder auch negative Nettoladung aufweisen, sprich amphoterer Natur sind. Das sind Proteine und Peptide, die abhängig vom umgebenden pH-Milieu entweder eine negative oder positive Nettoladung haben - je nachdem, ob die Aminogruppe protoniert oder die Carboxylgruppe dissoziiert ist.

Der pH-Wert, bei dem die Zahl der Nettoladungen genau ausgeglichen ist, wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Lässt man Proteine in einem Gel mit einem pH-Gradienten wandern, wird sich das Protein entweder in Richtung Kathode bewegen, wenn es an der Aufgabestelle positiv geladen ist, oder in Richtung Anode, wenn es an der Aufgabestelle negativ geladen ist. Das Protein wandert durch den pH-Gradienten bis zu seinem pI. Dort ist es entladen und bewegt sich nicht mehr.

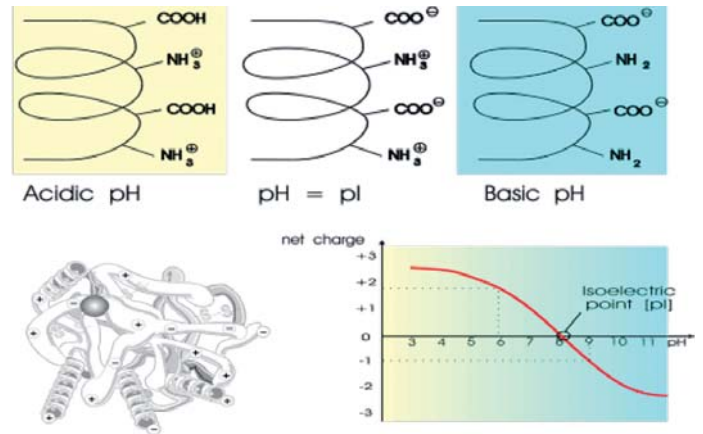


Abb. 8: Proteine als Aminosäureketten sind amphotere Moleküle, deren Nettoladung sich nach dem umgebenden pH-Milieu richtet und die sich bei Nettoladung = 0 an ihrem isoelektrischen Punkt befinden.

Nachdem die Isoelektrische Fokussierung in ihren Anfängen in den 1960er Jahren von Svensson und Vesterberg eingeführt und hauptsächlich als präparative Methode in größeren Glassäulen beschrieben und genutzt wurde, hat man kurz darauf die Möglichkeit entwickelt, IEF in geeigneten Gelmedien durchzuführen. Geeignet bedeutet dabei, dass die Gele möglichst wenig Siebeffekt auf die zu trennenden Proteine haben. Die Trennung soll also rein nach dem pI und nicht nach der Form und Größe des Proteins erfolgen.

Die IEF kann mit Proteinen im nativen Zustand durchgeführt werden und nach der Trennung haben die Proteine ihre biologischen Funktionen erhalten. Durch Einsatz von z.B. Harnstoff in den Gelen kann aber auch eine denaturierende IEF durchgeführt werden, bei der Quartär- und Tertiär-Struktur der Proteine beseitigt sind.

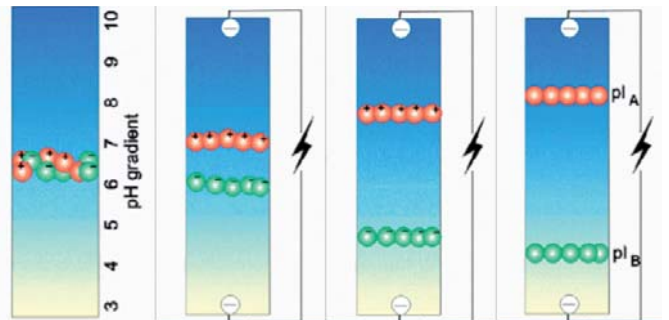


Abb. 9: In einem elektrischen Feld wandern die Proteine im pH-Gradienten bis sie eine Nettoladung von 0 haben. Der Umgebungs-pH-Wert ist der pI, isoelektrische Punkt der Proteine.

Für die Ausbildung eines pH-Gradienten bedient man sich zweier verschiedener Techniken: die ampholytbasierende Methode mit frei beweglichen amphoterer Moleküle (Ampholyten) oder fest in der Gelmatrix einpolymerisierten basischen und sauren Gruppen (Immobilinen).

5.2 Ampholyte

Ampholyte sind ein Gemisch von einer größeren Zahl (bis 1200) isomerer aliphatischer Oligoamino-Oligocarbonsäuren mit eng beieinanderliegenden isoelektrischen Punkten über einen pH-Bereich von ca. 3-10. Die amphoterer Moleküle haben die Eigenschaft, auch an ihren pI's puffernde Wirkung zu haben. Gelöst im wässrigen Milieu des Gels bilden die Ampholyte bei angelegter elektrischer Spannung einen puffernden Gradienten aus, in dem sich dann die eingebrachten Proteinmoleküle nach ihrem pI separieren lassen.

5.3 Immobilisierte pH-Gradienten

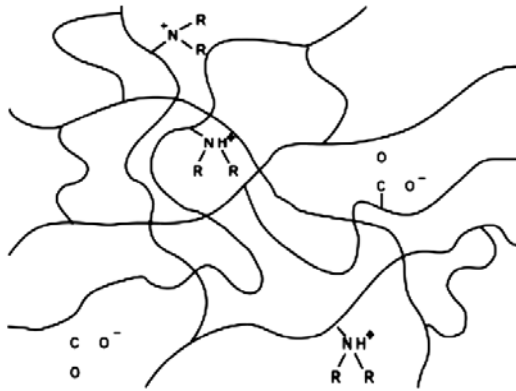


Abb. 10: Fest in die Polyacrylamidmatrix einpolymerisierte Immobililine bilden einen pH-Gradienten.

Bei den immobilisierten pH-Gradienten (IPG) wird ein Gradient durch in die Polymermatrix einpolymerisierte, puffernde Gruppen gebildet, den Immobilinen. Die Immobiline, von denen 12 verschiedene Moleküle mit pKa Werten zwischen 2.0 und 12.0 bekannt sind, sind schwache Säuren oder Basen, die in einer Säure-Base-Titration in einem Gradientengießverfahren mit der Acrylamidlösung zusammen zu einem Gel gegossen werden. Die Kombination der verschiedenen Säuren und Basen in dem Gradienten wird mit Henderson-Hasselbalch Gleichung berechnet. In der Praxis hat sich die Verwendung von IPG-Gelen und IPG-Streifen für die 2D Elektrophorese aus industrieller Fertigung durchgesetzt. Nur wenige Arbeitsgruppen stellen IPG-Gele selbst her.

Für die Durchführung der Isoelektrischen Fokussierung werden in vielen Bereichen Fertiggele eingesetzt. Es gibt vertikale IEF Gele für Minivertikalkammern, die hauptsächlich für eine gelegentlich durchgeführte Bestimmung des pI zur Charakterisierung eines Proteins eingesetzt werden. Für die wichtigen IEF Analytik- und Diagnostik-Anwendungen werden horizontale Elektrophoresekammern und sehr dünne horizontale IEF Gele eingesetzt, die konstruktionsbedingt wesentlich bessere Laufbedingungen für die IEF bieten.

Die Isoelektronische Fokussierung ist nach wie vor eine wichtige Analytikmethode für die Qualitätskontrolle von Lebensmitteln und Pharmazeutika. Sie wird auch in der Humandiagnostik und Artendifferenzierung bei Tieren eingesetzt.

Hier ein Beispiel für ein IEF Gel:

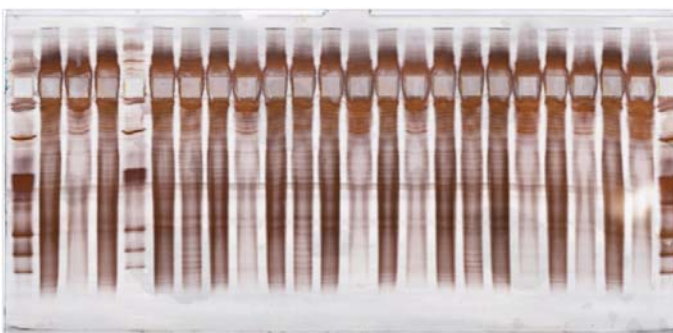


Abb. 11: FocusGel pH 6-11 mit verschiedenen Testproteinmischungen aus der SERVA Qualitätskontrolle, ammoniakalische Silberfärbung mit SERVA CSF Silver Staining Kit.

6. 2D Elektrophorese

Die Proteinseparationsmethode mit der höchsten Auflösung und der Fähigkeit aus komplexen Proteingemischen Tausende von „Protein-spots“ darzustellen, ist die 2D Elektrophorese. Hierbei werden die eindimensionale Isoelektrische Fokussierung und die eindimensionale SDS PAGE kombiniert. Sprich die Trennung nach dem größenunabhängigen isoelektrischen Punkt und der ausschließlich von der Molekülgröße abhängigen Trennung der SDS PAGE.

Bei der 2D PAGE werden für die erste Dimension überwiegend IPG-Streifen mit immobilisierten pH-Gradienten eingesetzt, die auf Folie polymerisiert sind und sich somit sehr leicht handhaben lassen. Vereinzelt werden auch lange Röhrgengele mit geringem Durchmesser verwendet, bei denen Trägerampholyte die Gradienten bilden.

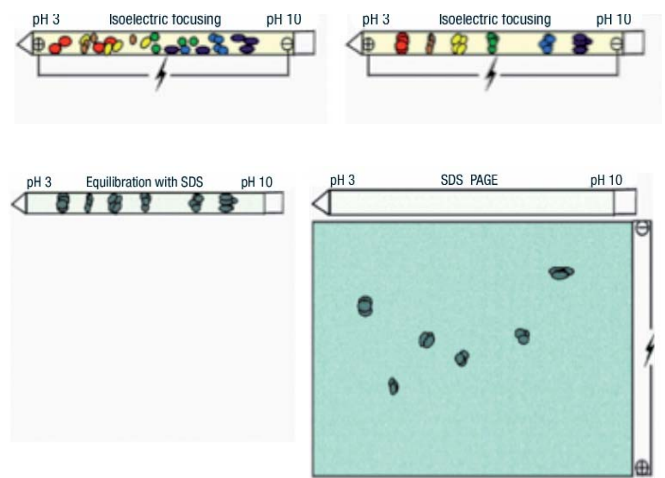


Abb. 12: Nach der IEF in der 1. Dimension wird der IPG Strip mit SDS äquilibriert und die Trennung nach der Molekülgröße in der 2. Dimension durchgeführt.

Nach der IEF in der 1. Dimension liegen die Proteine ohne Nettoladung an ihren isoelektrischen Punkten und würden sich im elektrischen Feld nicht weiter bewegen. Um sie in der nachfolgenden SDS PAGE auftreten zu können, müssen sie zunächst wieder in einen Ladungszustand gebracht werden. Dazu werden die Proteinmoleküle mit SDS äquilibriert, wobei die Detergenz-Moleküle die Proteine umhüllen. Da die SDS-Moleküle in der Lösung mit pH 8,8 weitgehend dissoziiert sind und eine negativ geladene Carboxylgruppe tragen, werden alle Proteine gleichförmig entsprechend der Länge ihrer Aminosäureketten negativ geladen. Gleichzeitig wird durch Zugabe reduzierender Thiole, wie DTT oder DTE, die Schwefelbrückenbildung des Cystein gehemmt. In einem weiteren Schritt werden die SH-Gruppen mit Iodacetamid alkyliert.

Für die Durchführung der 2D Elektrophorese gibt es eine Reihe von Geräten im Markt, durchgesetzt haben sich spezielle Horizontalkammern für die 1. Dimension mit IPG Strips, die neben einer effektiven Kühlung mittels Peltierelementen auch sehr hohe Spannungen von bis zu 12.000 Volt anbieten.

Die 2. Dimension wird horizontal oder vertikal durchgeführt. Es gibt eine Reihe von verschiedenen Vertikalkammern speziell für die 2D Elektrophorese, in denen bis zu 12 Gele gleichzeitig laufen können. Nachteile der vertikalen Kammerkonstruktion sind die großen notwendigen Pufferolumen von bis zu 24 Litern für einen Lauf und die unbefriedigende Kühlung der Gele, die zu nicht optimalen Trennungen führt.

Bessere Ergebnisse liefert die horizontale SDS-PAGE, wie schon bei der 1D Elektrophorese beschrieben. Ein Beispiel ist das HPE™-Tower-System von SERVA (siehe Abb. 13). Auch hier wird das Gel mit einer Metall-Aluminiumkeramik



Abb. 13: Beim HPE™-Tower System können vier Gele gleichzeitig laufen.

Verbundkühlplatte das Gel während der Elektrophorese gekühlt. Die präzise und effektive Kühlung erlaubt es, hohe Feldstärke anzulegen, was aufgrund der geringen Diffusion sehr gute Trennergebnisse ermöglicht.

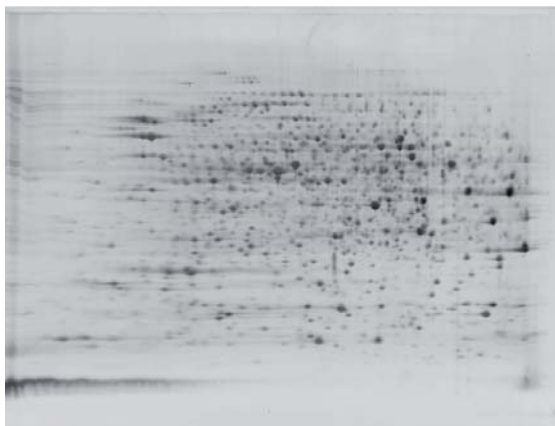


Abb. 14: Horizontales HPE™ 2D Gel 12,5 %, SERVA BlueStrip 24 cm pH 4-7, E.coli Extrakt, Gel gefärbt mit SERVA Purple Fluoreszenz Farbstoff, gelaufen auf dem HPE-Tower System.

Zusammenfassung

Häufig wurde die gelbasierende Proteinelektrophorese in den vergangenen 30 Jahren als eine in die Jahre gekommene Technik bezeichnet, die in der nahen Zukunft durch „modernere“ Verfahren abgelöst würde. Bisher hat sie aber wenig oder gar nichts von ihrer Attraktivität für die Proteinanalytik betreibenden Wissenschaftler weltweit eingebüßt.

Proteinelektrophorese ist noch immer die leistungsfähigste, reproduzierbarste und vielseitigste analytische Separationsmethode für die Bioanalytik. Acrylamid-Gele lassen sich sehr gut konservieren und archivieren, Proteine aus Gelen kann man mit entsprechenden Techniken direkt nach der Elektrophorese, aber auch nach Monaten oder Jahren aus den Gelen präparieren und die Proteine weiter analysieren und charakterisieren.

Gerne stehen wir Ihnen auch persönlich für eine Beratung zur Verfügung.



Robert-Hooke-Straße 8 · 28359 Bremen · Telefon 0421 / 1 75 99-0

www.omnilab.de · info@omnilab.de

Flexibel. Verlässlich. Persönlich.



Berlin

Telefon 03322 / 20 24 69

Braunschweig

Telefon 05308 / 69 38 64

Essen

Telefon 0201 / 1 05 46 34

Frankfurt

Telefon 0160 / 90 89 82 56

Göttingen

Telefon 0551 / 6 94 02-16

Hamburg

Telefon 040 / 65 90 95-0

Hannover / Gehrden

Telefon 05108 / 91 67-0

Heidelberg

Telefon 0151 / 18 00 02 90

Kiel

Telefon 040 / 65 90 95 40

Leipzig / Markkleeberg

Telefon 034299 / 7 56 91

Magdeburg

Telefon 039292 / 6 56 51

München

Telefon 089 / 6 92 57 18

Münster

Telefon 0421 / 17 59 93 24

Nürnberg

Telefon 089 / 6 92 57 18

Osnabrück

Telefon 0421 / 17 59 93 21

Rostock

Telefon 038455 / 2 23 29

Ruhrgebiet

Telefon 01520 / 1 66 98 00

Ulm

Telefon 089 / 6 92 57 18

