

6 Theorie zur nativen und denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese

Diese theoretische Ausführung wird für die Durchführung der Versuche „Proteolytischer Verdau von Bacteriorhodopsin“ und „In-Gel Aktivitätstests von Atmungskettenkomplexen aus Rinderherzmitochondrien“ benötigt.

6.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Den elektrophoretischen Verfahren liegt zugrunde, dass sich Teilchen mit einer von Null verschiedenen Nettoladung in einem elektrischen Feld bewegen. Die resultierende Wanderungsgeschwindigkeit hängt vom elektrischen Feld und der sog. elektrophoretischen Mobilität der Teilchen ab. In diese fließen Größen wie die Nettoladung bei einem bestimmten pH-Wert, Teilchenform und -größe, Temperatur und der elektrische Widerstand ein.

<p>Durch das angelegte elektrische Feld wirkt auf die Teilchen eine beschleunigende Kraft F_e:</p> $F_e = z_i \cdot e_0 \cdot E$ <p>z_i: Ladungszahl des Ions i e_0: Elementarladung [$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$] E: elektrische Feldstärke [$\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$]</p>	<p>Der Beschleunigung entgegengerichtet ist die Reibungskraft F_R:</p> $F_R = k \cdot \eta \cdot v$ <p>k: Konstante [cm] η: Viskosität der Lösung [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$] v: Wanderungsgeschwindigkeit [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]</p>
<p>Für kugelförmige Teilchen gilt das Stokes'sche Gesetz: $k = 6\pi r$ Dabei ist r der hydrodynamische Radius des Teilchens (Stokes Radius). Im Kräftegleichgewicht $F_e = F_R$ bewegt sich ein Teilchen i mit konstanter Wanderungsgeschwindigkeit:</p> $v_i = \frac{z_i \cdot e_0}{6\pi\eta r} \cdot E$	

Die elektrophoretische Mobilität ist eine substanzspezifische Größe, der Proportionalitätsfaktor zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und der angelegten Feldstärke:

$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{z_i \cdot e_0}{6\pi\eta r} \left[\frac{\text{cm}^2}{\text{V} \cdot \text{s}} \right]$$

Neben den in obiger Formel aufgeführten Parametern muss berücksichtigt werden, dass geladene Teilchen von einer Hydrathülle und einer „Ionenatmosphäre“ entgegengesetzter Ladungen umgeben sind (Debye-Hückel-Theorie). Solche Effekte führen dazu, dass die Mobilität bei zunehmender Ionenstärke der Lösung abnimmt (Relaxationseffekt). Daher sind Elektrophoresen empfindlich gegenüber hohen Salzkonzentrationen.

Bei der Gelelektrophorese erfolgt die Trennung in einem Gel, das durch einen Molekularsieb-Effekt die Mobilität selektiv herabsenken kann. Kleine negativ geladene Moleküle wandern z.B. am schnellsten in Richtung der positiv geladenen Anode (siehe 6.1). Für Proteine haben sich Polyacrylamidgele zum wichtigsten Trennmedium bei der analytischen Elektrophorese entwickelt. Solche Gele sind chemisch inert und sehr stabil. Proteine in klaren, durchsichtigen Polyacrylamidgelen lassen sich über diverse Methoden anfärben und somit visualisieren.

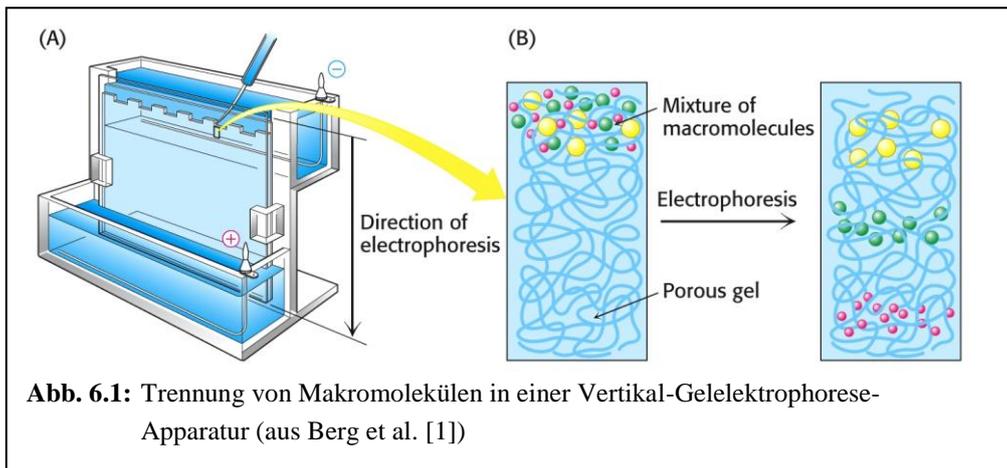


Abb. 6.1: Trennung von Makromolekülen in einer Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur (aus Berg et al. [1])

6.2 Herstellung von Gelen

Das Herstellen von Gelen für unterschiedliche Trennprobleme ist recht einfach (das Hauptproblem ist meist das Abdichten der verwendeten Apparatur). Allerdings muss man bei der Handhabung darauf achten, dass Acrylamid-Monomere toxisch sind (Haut- und Nervengift). Daher sollte das Ansetzen der Gele immer im Abzug mit Nitrilhandschuhen und Schutzbrille erfolgen. Außerdem dürfen die dabei entstehenden Abfälle nicht in den Hausmüll/Abfluss gelangen, sondern müssen separat entsorgt werden (Pipetten mit Isopropanol spülen, Acrylamidabfallbehälter nutzen, auspolymerisierte Gele in Feststofftonne entsorgen).

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele werden Acrylamidmonomere in Gegenwart des Quervernetzers radikalisch polymerisiert, um ein geeignetes Netzwerk zu erhalten. Hierbei spielen die Angaben der Gesamtacrylamidmenge T (Acrylamid + Quervernetzer) und der Quervernetzer-Anteil C eine wichtige Rolle:

$$T = \frac{\text{Gramm}_{\text{Acrylamid}} + \text{Gramm}_{\text{Quervernetzer}}}{\text{mL}_{\text{Lösung}}} \cdot 100 \text{ [\%]}$$

$$C = \frac{\text{Gramm}_{\text{Quervernetzer}}}{\text{Gramm}_{\text{Acrylamid}} + \text{Gramm}_{\text{Quervernetzer}}} \cdot 100 \text{ [\%]}$$

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird häufig N,N' -Methylenbisacrylamid als Quervernetzer eingesetzt (siehe Abb. 6.2). Um eine Kettenreaktion zu initialisieren, eignet sich z.B. die Kombination aus Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator.

Die Porengröße im Gel liegt oft zwischen 3 und 6 nm und ist sowohl von T als auch von C abhängig sowie von der Polymerisationsgeschwindigkeit. Wenn C konstant ist, werden die Poren mit zunehmendem T kleiner. Beim Quervernetzer ist die Situation schwieriger: Die kleinsten Poren entstehen bei $C=5\%$. Niedrigere Werte für C führen zu größeren Poren und bei $C>5\%$ werden Gele spröde.

Ist eine hohe Auflösung der elektrophoretischen Trennung erforderlich, ist es oft sinnvoll Gradientengele aus einer Lösung mit hoher und einer mit niedriger Gesamtacrylamidmenge zu gießen. Hierfür kann ein Gradientenmischer eingesetzt werden, um ein Netzwerk zu erhalten, bei dem die Proteine zunächst in den

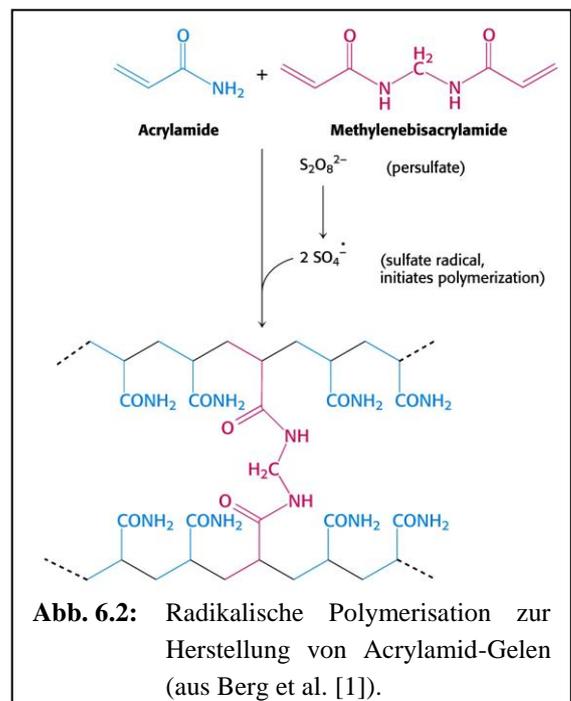


Abb. 6.2: Radikalische Polymerisation zur Herstellung von Acrylamid-Gelen (aus Berg et al. [1]).

weitmaschigen Teil einlaufen und schließlich durch den engmaschigen Bereich immer stärker zurückgehalten werden.

6.3 Elektrophorese-Verfahren

Durch den Einsatz von Gelen als separierendes Netzwerk lassen sich Diffusionseffekte soweit verringern, dass unterschiedliche Proteine als diskrete Banden laufen. Das Grundprinzip einer solchen **Zonenelektrophorese** ist der Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität. Dabei sind die zu analysierenden Proteine von einer homogenen Elektrolytlösung umgeben.

Neben der Zonenelektrophorese in homogenen Elektrolyten sind auch häufig Systeme aus mindestens zwei verschiedenen Pufferionen im Einsatz. Wenn diese Ionen sich deutlich in ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden, ist es auch möglich unterschiedliche Proteine mit der gleichen Geschwindigkeit wandern zu lassen (**Isotachophorese**). Die Leit-Ionen haben eine hohe Mobilität und wandern direkt nach dem Anlegen einer Gleichspannung allen anderen Ionen voraus. Dann folgen die auf das Gel aufgetragenen Proteine. Die Folge-Ionen mit einer niedrigen Mobilität bilden den Abschluss. Eine derartige Zusammensetzung hat zur Folge, dass in einer Probe verteilte Proteine zu einer scharfen Bande konzentriert werden.

Bei der **diskontinuierlichen (Disk-) Elektrophorese** macht man sich beide Prinzipien zunutze:

Im Tris-Glycin-System (nach Laemmli [2]) befindet sich oben an der Kathodenseite ein Tris-Glycinat-Puffer (**niemals** pH-Wert mit Salzsäure einstellen!) mit pH 8,3, darunter folgt die Zone mit der zu analysierenden Proteinprobe (Abb. 6.3). Unter der Probe liegt das Sammelgel mit einem Tris-Chlorid-Puffer bei pH 6,8. Durch diese Anordnung wandern die Chlorid-Ionen als Leit-Ionen voraus. Die Proteine folgen und werden konzentriert (Stacking-Effekt). Die Glycinat-Ionen kommen aus dem Kathodenpuffer in den Sammelgel-Bereich mit niedrigem pH-Wert. Da der pH-Wert von 6,8 dem isoelektrischen Punkt von Glycin nahe kommt, wandert Glycinat nur sehr langsam und bildet das Folge-Ion.

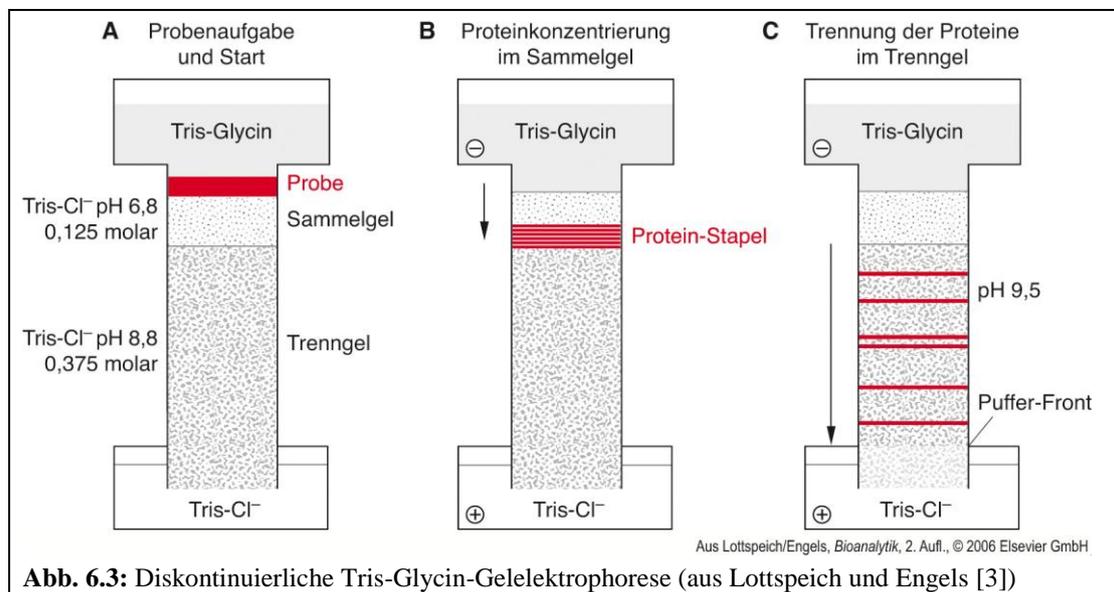


Abb. 6.3: Diskontinuierliche Tris-Glycin-Gelelektrophorese (aus Lottspeich und Engels [3])

Unter dem Sammelgel befindet sich das Trenngel mit einem deutlich höheren pH-Wert von 8,8 (Tris-Chlorid-Puffer). Durch die pH-Änderung wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Glycinat-Ionen erhöht, so dass sie die Proteinzone (Protein-stapel) überholen können. In dem so entstehenden homogenen Puffersystem kommen die Proteine aber vom weitmaschigen Sammelgel in das engmaschige Trenngel. Als Konsequenz trennt sich eine Proteinmischung nach dem Prinzip der Zonenelektrophorese auf.

Neben dem aufgeführten Tris-Glycin-System gibt es eine Reihe weiterer Puffersysteme. Je nach Anwendung bieten sich hier viele Variationsmöglichkeiten. Beispielsweise eignet sich das Tris-Tricin-System (nach

Theorie zur nativen und denaturierenden Polyacrylgelelektrophorese

Schägger et al. [4]) für die Trennung kleiner Proteine oder von Peptiden. Eine wichtige Entscheidung bei der Vorbereitung ist die Wahl, ob man unter nativen oder denaturierenden Bedingungen arbeiten will.

Für die **denaturierende Elektrophorese** werden häufig die Detergenzien SDS (Natrium-Dodecylsulfat) oder CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) eingesetzt. SDS bindet in 1%iger Lösung an Proteine mit einem ungefähr konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS pro g Protein. Bei der Bildung der SDS-Protein-Komplexe, vor allem in Anwesenheit von Disulfid-Brücken spaltenden Thiolverbindungen (z.B. 2-Mercaptoethanol und DTT), werden Quartär-, Tertiär- und auch Sekundärstrukturen aufgelöst (Hitze verstärkt diesen Effekt). Proteinkomplexe verlieren ihren Zusammenhalt und disaggregieren in ihre Untereinheiten. Dabei entstehen negativ-geladene SDS-Protein-Komplexe mit entfalteter Polypeptidkette, also ähnlicher Form. Die elektrophoretische Mobilität der gestreckten Proteine hängt nun vor allem von ihrer molaren Masse ab. Über einen bestimmten Bereich (z.B. abhängig von der Gesamtacrylamid- und der Quervernetzer-Konzentration) ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der molaren Masse und der Wanderungsstrecke (siehe Abb. 6.4). Im Praktikumsversuch wird der LMW-Standard eingesetzt (siehe Tab. 6.1).

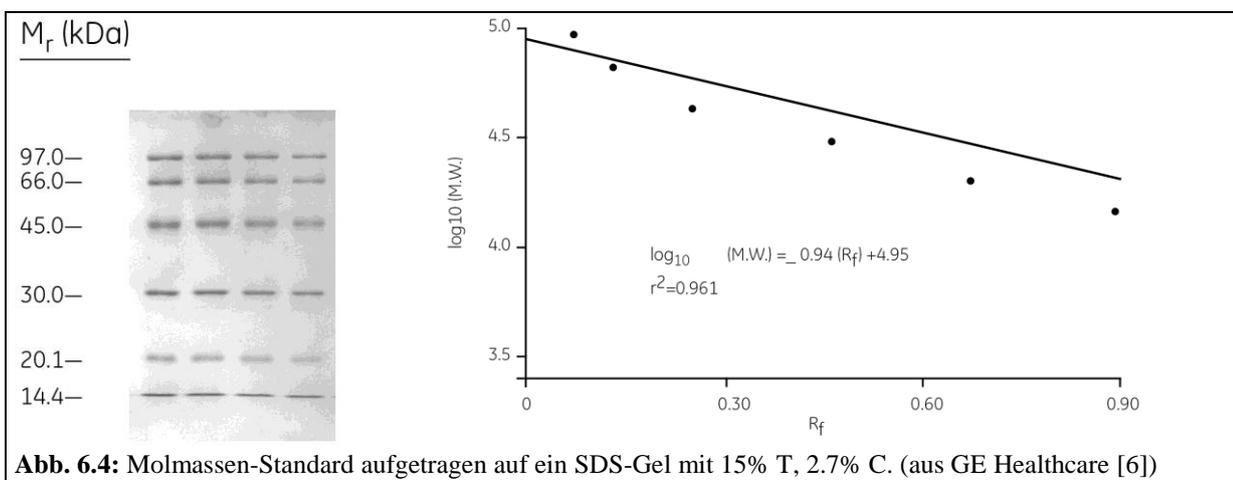


Abb. 6.4: Molmassen-Standard aufgetragen auf ein SDS-Gel mit 15% T, 2.7% C. (aus GE Healthcare [6])

Bei der **nativen Elektrophorese** müssen geeignete Pufferbedingungen im Gel eingestellt sein (z.B. pH-Wert, Salzkonzentration), um Proteine in ihrer physiologischen Form zu erhalten. Proteinkomplexe werden nicht in ihre Untereinheiten gespalten, sondern bleiben intakt, und elektrophoretisch getrennte Enzyme behalten ihre katalytische Aktivität. Mit kolorimetrischen Tests kann direkt im Gel enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Bei einer Variante (Blau-native Elektrophorese nach Schägger [7]) wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (CBBG) eingesetzt. CBBG bindet an hydrophobe und kationische Bereiche von Proteinen und verleiht ihnen eine netto-negative Ladung (die Variante G250 ist hierfür besser geeignet als R250, die für die Gelfärbung genutzt wird). Bei Membranproteinen kann CBBG das umgebende Detergens zum Teil ersetzen. Analog zu einer SDS-Gelelektrophorese wandern dann Protein-Farbstoff-(Detergens)-Komplexe im elektrischen Feld zur Anode. Da native Proteinkomplexe deutlich höhere molare Massen als einzelne Proteinuntereinheiten aufweisen, gibt es hierfür spezielle Proteinstandards zur Kalibrierung (siehe Tab.6.2).

Theorie zur nativen und denaturierenden Polyacrylgelelektrophorese

Tab. 6.1: Zusammensetzung des LMW-Protein-standards für SDS-Gele. Bei kleinen Gelen ist 1 µL pro Spur aufzutragen.

Protein	M _r [Da]	Quelle	µg pro 200 µl
Phosphorylase b	97000	rabbit muscle	67
Albumin	66000	bovine serum	83
Ovalbumin	45000	chicken egg white	147
Carboanhydrase	30000	bovine erythrocyte	83
Trypsininhibitor	20100	soybean	80
□-Lactalbumin	14400	bovine milk	116

Tab. 6.1: Zusammensetzung des HMW-Protein-standards für native Gele. Bei kleinen Gelen sind 4 µl pro Spur aufzutragen.

Protein	M _r [Da]	Quelle	µg pro 100 µl
Thyroglobulin	669000	porcine thyroid	76
Ferritin	440000	equine spleen	50
Katalase	232000	bovine liver	36
Lactatdehydrogenase	140000	bovine heart	48
Albumin	66000	bovine serum	40

6.4 Quellen

- [1] Berg, J.M., J.L. Tymoczko, und L. Stryer, Biochemistry. 5th edition. 2002, Palgrave Macmillan.
- [2] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**: 680-685.
- [3] Lottspeich, F. und J.W. Engels, Bioanalytik. 2. Aufl. 2006, Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, München.
- [4] Schägger, H. und G. von Jagow (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- [5] Healthcare, G., Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis. 17-0446-01PL Rev D 2006. 2007, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK.
- [6] Heidrich, N.G. (2007) Optimierungen zur Elution der Chloroplasten-F₀F₁-ATP-Synthase aus präparativen, farblos-nativen Polyacrylamidgelen, Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt
- [7] Schägger, H. Und G. von Jagow (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal. Biochem.* **199**: 223-231.