

Proteinreinigung durch Chromatographie

1 Gelfiltration: Größen-Ausschlussverfahren

- UV-Absorption von Proteinen I bei 280nm
vorallem Tyr, Trp und Phe
- DNA hat Maximum bei 260nm
- Gelfiltration: kleine Gelfeilchen
kleine Proteine wandern lang (lagern zwischen Geln)
große Proteine gehen schnell durch
⇒ gut zum unpuffern und entsalzen

2 Ionenaustausch Trennung nach Ladung

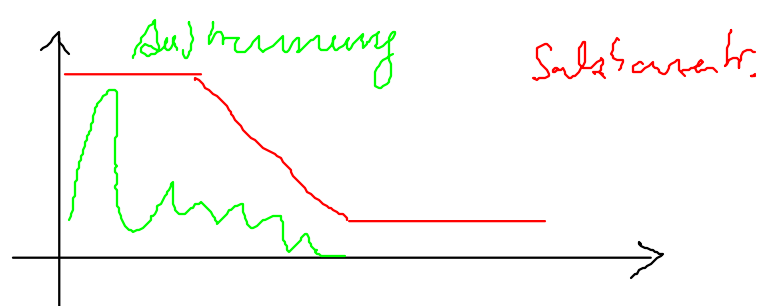
- Ionenaustauscher Anionen- oder Kationenaustauscher
- Zugabe eines Salzgradienten ⇒ Auftrennung innerhalb
des Kationenan oder Anionen
⇒ elektrostatische WW stark
⇒ Salz schwächt diese WW

Beispiele: Anionenaustauscher
DEAE⁺

Kation-
-COO⁻ Carboxy methyl

3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

- weniger Salzgradient



4 Affinitätschromatographie

⇒ sehr individuell

Beispiel Transkriptionsfaktor wohngebunden

⇒ Protein DNA auf Säule (auch: Liganden, Substrate, Antikörper, Zucker für Lektine)

⇒ setze Transkriptionsfaktor frei

„Affinitäts-Tag“

• His-Tag : Protein - (His)₆

⇒ Protein auf Nickel-säule einlagern

⇒ Überschuss von Imidazol ⇒ Protein ausgewaschen

• GST : Glutathion S-Transferase

• MBP Maltose bindendes Protein

• Strep tag (bindet stark an Biotin)

Proteinanalyse / Identifizierung

• Elektrophorese : Trennung nach Ladung (native PAGE)
Größe (SDS-PAGE)
isoelektr. Punkt (pI)

z.B. Gel elektrophorese

• Native PAGE : Polyacrylamid gel elektrophorese

⇒ angelegt Spannung ⇒ Protein nach Ladung trennen

kleine Proteine passen besser durch Gelgeflecht
geladene Proteine wandern schneller

• SDS-PAGE

⇒ nach Größe

Zusatz von SDS überträgt Ladung der Proteine

1 SDS bindet an 2 Aminosäuren

⇒ Farbstoff : Coomassie - blue

färbt Protein ein

Identifikation

- Western-blot: Darstellen
- ELISA enzym-linked immunosorbent assay: quantifiziert

Klassenbestimmung

- Gel-filtration: sehr groß, dient der Bestimmung

- SDS-PAGE: groß

Kapillarelektrophorese: groß, aber hochempfindlich

- Ultra-zentrifugation: groß, Bestimmung

- Massenspektrometrie

MALDI: matrix assisted laser desorption ionisation

MALDI-TOF: TOF time-of-flight

ESI: electrospray ionisation

MALDI hoch empfindlich

- Selbeneri: $\frac{m}{z}$ = Flugzeit im Vakuum

⇒
Ladung

- Fliegende Proteine: mit Laser und Farbstoffmolekülen

Farbstoffmoleküle versprühen durch Laser, nehmen Proteine mit

wenig zusätzliche Ladung

⇒ Gesamtmasse der Proteine

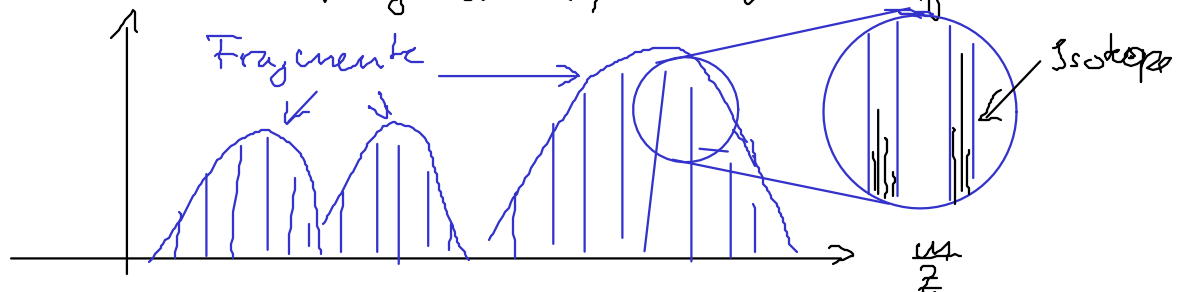
ESI sehr genau und hoch empfindlich

Proteine aus Lösung ⇒ Fliegen

kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom ⇒ "Spray"

Proteine zerbrechen in Fragmente, wenn Flüssigkeit

verdunstet



e.B : MALDI nach Trypsin-Verdau von BSA (schneidet K_1, R)