

# Proteinreinigung durch Chromatographie

## 1 Gelfiltration: Größen - Ausschleissverfahren

- UV-Absorption von Proteinen I bei 280nm vor allem Tyr, Trp und Phe
- DNA hat Maximum bei 260nm
- Gelfiltration: Kleine Proteine gelangen  
kleine Proteine brauchen lang (langen zwischen gleichen)  
große Proteine gehen schnell durch  
⇒ gut zum anpassen und entsalzen

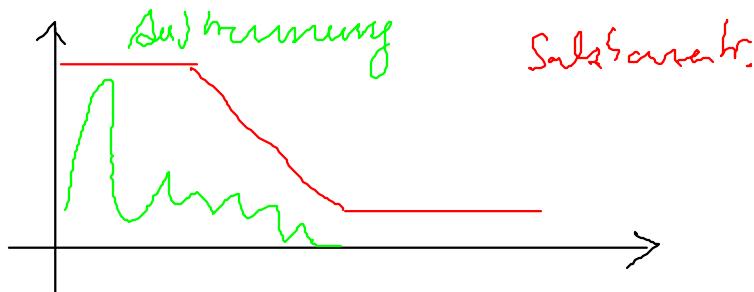
## 2 Ionenaustausch Trennung nach Ladung

- Ionenaustauscher Anionen- oder Kationenaustauscher
- Zugabe eines Salzgradienten ⇒ Selbsttrennung innerhalb der Kationen oder Anionen  
⇒ elektrostatische WW start  
⇒ Salz schwächt diese WW

Beispiele: Anionenaustauscher    Kation-  
DEAE<sup>⊕</sup>    -COO<sup>⊖</sup> Carboxymethyl

## 3 Hydrophobe Interaktionschromatographie

- weniger Salzgradient



## 4 Affinitätschromatographie

⇒ sehr individuell

Beispiel Transkriptionsfaktor wahrsprechend

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

⇒ selber Transkriptionsfaktor frei

"Affinität-Tag"

- His-Tag : Protein - (His)<sub>6</sub>

⇒ Protein auf Nickel-säule einfangen

⇒ Überschuss von Trisazol ⇒ Protein ausgewaschen

- GST : Glutathion S-Transferase

- MBP Maltose bindendes Protein

- streptavidin (steckt 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)

⇒ angelegte Spannung ⇒ Protein nach Ladung trennen  
kleine Proteine passen besser durch Gelgeflecht  
große Proteine wandern schneller

- SDS-PAGE

⇒ nach Größe

Zugabe von SDS überdeckt Ladung der Proteine

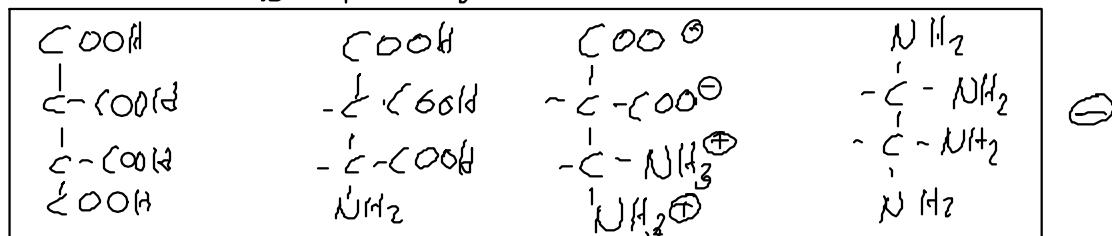
1 SDS bindet an 2 Aminosäuren

⇒ Farbstoff : Coomassie - blau

färbt Protein ein

• Isoelektische Fokussierung

Gel mit pH-Gradienten  
Ampholyte



Anode  $\text{pH} \approx 4$        $\text{pH} \approx 7$        $\text{pH} \approx 10$  Kathode

⇒ Trennung der Ampholyte (Spannung)

führt zu einem pH-Gradienten

⇒ Proteine bleiben bei dem pH stehen, wo sie geladen sind

• 2D-Gel elektrophorese:

zuerst Isoelektische Fokussierung dann SDS

⇒ aufarbeiten mit  $\text{Ag}^+$ -Trennen oder Coomassie-blue

• 2D-Gel elektrophorese und Massenspektrometrie (MS)

• Kapillargel elektrophorese

Quarzcapillare mit Gel

⇒ verläuft sehr schnell, hohe Spannung möglich  
Danach wird gel abgeleitet durch große Oberfläche

UV-Absorption bei  $280\text{ nm}$  (Warburg Test)

• Einfarben:

Silbernitrat-Farbtang

Coomassie Blue

Biuret, Lowry: Komplex mit  $\text{Cu}^{2+}$

Reduktion von  $\text{Cu}^{2+} \Rightarrow$  blau Einfarbung

# Identifikation

- Western-Blot: Darstellen
- ELISA enzyme linked immunosorbent assay : quantifiziert

# Massenbestimmung

- Cefiltration : sehr groß, dient der Aufräumung
- SDS-PAGE : groß
- Kapillarelektrophorese : groß, aber hochempfindlich
- Ultra Zentrifugation : groß, Destruierend
- Massenspektrometrie
  - MALDI : matrix assisted laser desorption ionisation
  - MALDI-TOF : TOF time-of-flight
  - ESI : electrospray ionization

## MALDI hoch empfindlich

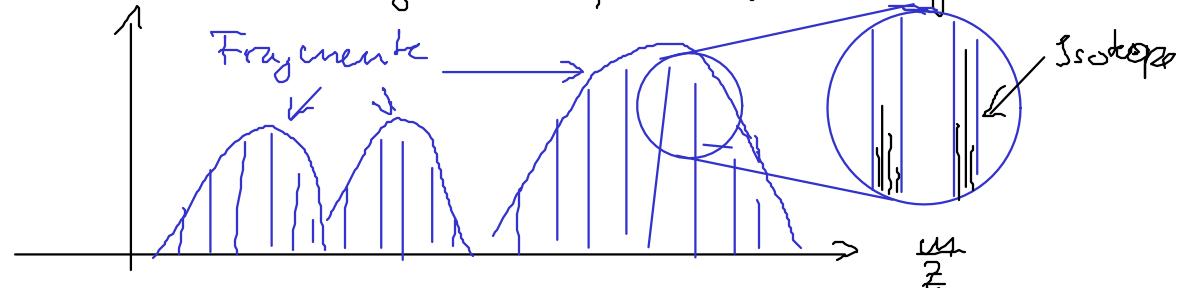
- Allgemein:  $\frac{m}{z} = \text{Flugzeit im Vakuum}$   
 $\xrightarrow{\text{Ladung}}$
- Fliegende Proteine: mit Laser und Farbstoffmolekülen  
Farbstoffmoleküle gespalten durch Laser, welcher Protein mit  
sehr geringer zerschlagender Ladung  
 $\Rightarrow$  Gesamtmasse der Proteine

## ESI sehr genau und hoch empfindlich

Proteine aus Lösung  $\Rightarrow$  Fliegen

Kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl  $\Rightarrow$  "Spray"

Proteine zerbrochen in Fragmente, wenn Flüssigkeit  
verdampft



z.B.: MALDI nach Trypsin - Verdau von BSA (schwierigster K, R)