

Protokoll zur Übung Gelelektrophorese

im Rahmen des Praktikums
Instrumentelles und Bioanalytisches Labor an der TU Wien

Durchgeführt bei
Univ.Ass. Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Martina Marchetti-Deschmann

Verfasser des Protokolls: **Gwendolin Korinek 0625083 & Daniel Bomze 0726183**

Versuche durchgeführt am 11.01.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretischer Teil	3
1.1	Aufgabenstellung	3
1.2	SDS-PAGE	3
2	Praktischer Teil	4
2.1	Benutzte Chemikalien	4
2.2	Benutzte Geräte und Parameter	4
2.2.1	Benutzte Geräte für die Gelherstellung und Elektrophorese	4
2.2.2	Elektrophorese-Parameter	5
2.3	Versuchsdurchführung	6
2.4	Auswertung	7
2.4.1	Kalibrierfunktion	10
2.4.2	Molekulargewichtsbestimmung	12
2.5	Zusammenfassung & Diskussion	12

1 Theoretischer Teil

1.1 Aufgabenstellung

Proteine mit bekanntem Molekulargewicht sowie zwei Proben sollten mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Mit Hilfe der Molekulargewichte der bekannten Proteinen sowie deren Rf-Werten sollte eine Kalibrationsfunktion erstellt werden, anhand derer das Molekulargewicht der beiden unbekanntenen Proben ermittelt werden konnte. Zusätzlich sollten wichtige Elektrophoreseparameter beobachtet und dokumentiert werden.

1.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE bezeichnet *Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese*. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Protein-SDS Komplexen werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Als Matrix für die zu trennenden Proteine verwendet man ein Polyacrylamidgel. Je nach Anteil an Bisacrylamid (Quervernetzer) und Gesamtkonzentration lassen sich Gele mit unterschiedlichen Eigenschaften anfertigen. Damit die Analyten nur nach ihrer Größe, aber nicht nach ihrer Ladung aufgetrennt werden, wird Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt. Dessen lipophile Ketten lagern sich an die Proteine an, und durch den anionischen Sulfat-Rest des Moleküls werden die ursprünglichen Ladungen der Proteine überlagert. So erhält man für alle aufzutrennenden Proteinkomplexe dasselbe Ladung-zu-Masse-Verhältnis und damit dieselbe Mobilität in freier Lösung. Daher werden die zu analysierenden Proteine nur aufgrund ihrer Größe im Elektrophoresegele unterschiedlich retentiert. Zur Auflösung der räumlichen Strukturen der Proteine erfolgt zusätzlich vor der Probenaufgabe eine Reduktion von Disulfidbrücken durch Mercaptoethanol.

2 Praktischer Teil

2.1 Benutzte Chemikalien

Acrylamid-/Bisacrylamidmonomerlösung: 30 %T, 2,7 %C

Trenngelpuffer: 1,5M Tris-Cl bei pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5M Tris-Cl bei pH 6,8

10 %ige SDS-Lösung

Ammoniumpersulfat (Radikalstarter)

N, N, N', N'-Tetramethylethylenamin (Katalysator für Polymerisation)

Denat.-Mix: 0,125 M Tris-Cl, 8,4% SDS, 20% Glycerin, 10% 2-Mercapthoethanol, 1% Bromphenolblau bei pH 6,8

Elektrophoresepuffer: 0,025M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS bei pH 8,3

Färbelösung: 0,025% Coomassie Blau R-250, 40% Methanol, 7% Essigsäure

Entfärbelösung I: 7% Essigsäure, 40 % Methanol

Entfärbelösung II: 7% Essigsäure, 5% Methanol

2.2 Benutzte Geräte und Parameter

2.2.1 Benutzte Geräte für die Gelherstellung und Elektrophorese

Hoefer Mighty Small SE 245 Dual Gel Caster

Hoefer SE 250 Elektrophorese-Apparatur

EPS 301 Netzgerät

Weiters wurde ein Ultraschallbad für die Entgasung der Lösungen, eine Tischzentrifuge zum Abtrennen von eventuell ausgefallenen Bestandteilen der Proteinlösungen sowie eine Heizplatte zur Denaturierung der Proteine verwendet. Das Gießen der Gele erfolgte zwischen einer Glas- und einer Aluminiumoxidplatte.

2.2.2 Elektrophorese-Parameter

Für die Herstellung des Trenngels wurde eine 30%T, 2,7% C Acrylamid-/ Bisacrylamidmonomerlösung verwendet. Die Geldicke betrug 1 mm, die Trenngelhöhe rund 6 cm. Der Trennvorgang wurde bei Gel A nach 57 Minuten und bei Gel B nach 60 Minuten beendet. Die zugehörigen Strom/Spannungskurven für jede Trennung sind in den Abbildungen 2.1 und 2.2 dargestellt.

Die Konzentrationen der Standardproteine betragen jeweils 1 mg/mL. Da diese noch jeweils 1:1 mit Denaturierungsmix versetzt wurden, musste dies für die weitere Berechnung berücksichtigt werden. Die tatsächlichen Konzentrationen der Standardproteine sowie die absoluten Proteinmengen am Gel sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 aufgelistet. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blue. Dieser Farbstoff lagert sich mit seinen lipophilen Ketten an die lipophilen Reste der aufgetrennten Proteine an und sorgt für deren Blaufärbung. Die anschließende Entfärbung erfolgte zuerst in Entfärbebad I (30 Minuten) und anschließend über Nacht in Entfärbebad II. Als Frontmarker diente Bromphenol-Blau. Anhand der Position des Frontmarkers und jener der Proteine konnten nun deren R_f -Werte bestimmt werden. Mit diesen sowie den Molekulargewichten der bekannten Proteine wurde nun eine Kalibrierfunktion erstellt.

Protein-Probe	Aufgegebenes Volumen [μL]	Aufgegebene Proteinmenge [μg]
Standardproteinmix	10	5 ¹
Probe A	10	10
Enolase	10	10
Myoglobin	10	10
BSA	10	10
Probe B	10	10
Conalbumin	10	10
Carbonic Anhydrase	10	10
Probe A	10	10
Standardproteinmix	10	5 ¹

Tabelle 2.1: Aufgegebene Proteinmengen auf Gel A

¹Die Proteinmenge beim Standardproteinmix bezieht sich auf die Gesamtproteinmenge. Dieser besteht aus den gleichen Volumina der 5 Standardproteinen, welche anschließend mit Denaturierungsmix 1:1 versetzt wurden.

Protein-Probe	Aufgegebenes Volumen [μL]	Aufgegebene Proteinmenge [μg]
Standardproteinmix	5	2,5 ¹
Probe A	3	1,5
Enolase	3	1,5
Myoglobin	3	1,5
BSA	3	1,5
Probe B	3	1,5
Conalbumin	3	1,5
Carbonic Anhydrase	3	1,5
Probe A	3	1,5
Standardproteinmix	5	2,5 ¹

Tabelle 2.2: Aufgegebene Proteinmengen auf Gel B

2.3 Versuchsdurchführung

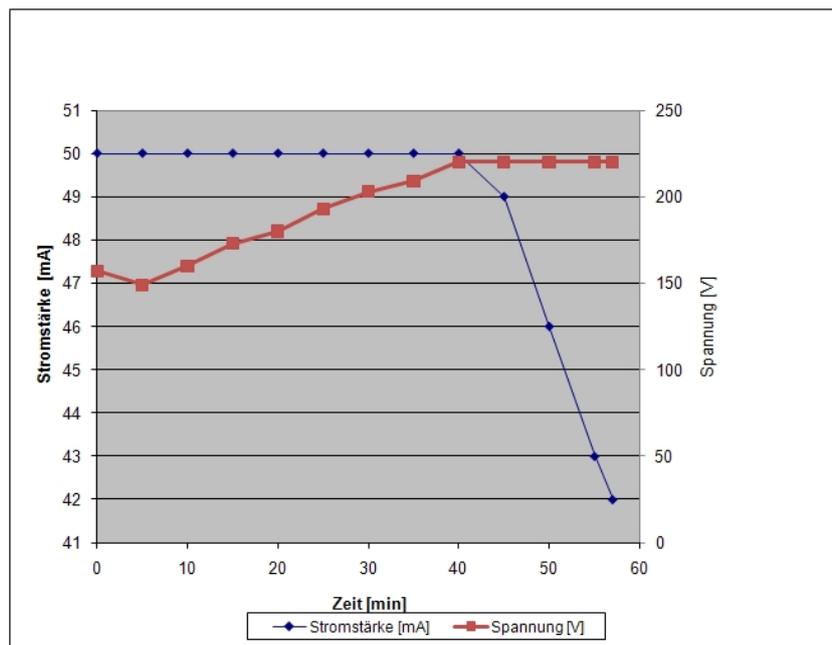


Abbildung 2.1: Strom und Spannungswerte gegen die Zeit aufgetragen bei der Elektrophorese des Gels A

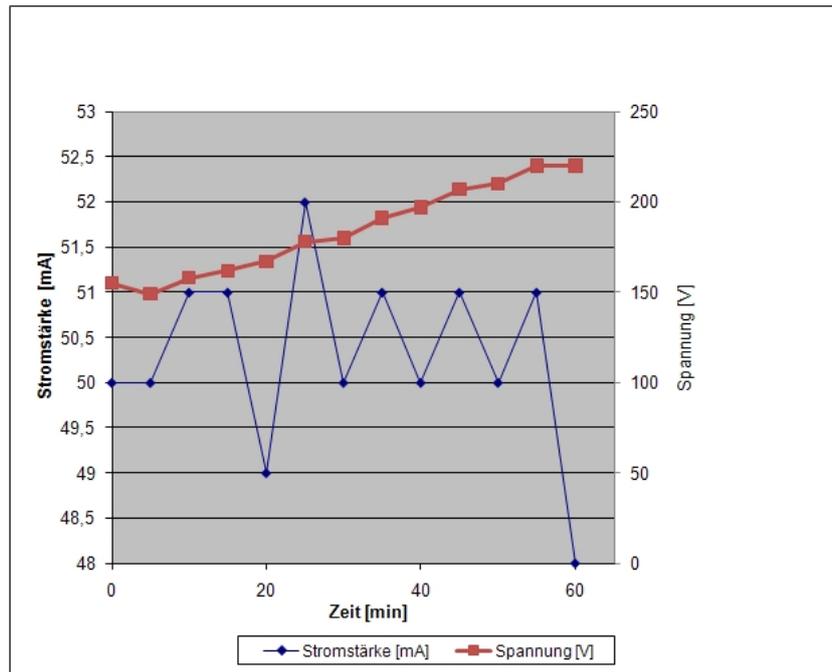


Abbildung 2.2: Strom und Spannungswerte gegen die Zeit aufgetragen bei der Elektrophorese des Gels B

Deutlich zu sehen ist sowohl beim Gel A (Abb. 2.1) als auch beim Gel B (Abb. 2.2) eine konstante Zunahme der Spannung mit der Zeit nach den ersten fünf Minuten. Beim Gel A ist der Grenzwert der Spannung (220 V) nach 40 Minuten erreicht. Beim Gel B werden die 220 V erst nach 60 Minuten erreicht. Weiters sieht man, dass der fließende Strom in Gel A die ersten 40 Minuten konstant ist und dann relativ stark abnimmt. Bei Gel B ist keine so starke Stromabnahme zu sehen, jedoch schwankt der Strom während der Elektrophorese mehr als bei Gel A.

2.4 Auswertung

Um das Molekulargewicht von zwei unbekanntem Proteinen zu bestimmen sollte mit Hilfe fünf bekannter Proteine eine Kalibrationsfunktion erstellt werden. Dazu wurden diese Proteine parallel zu den Proben auf dem Gel mittels Elektrophorese aufgetrennt. Tabelle 2.3 zeigt die dafür benutzten Proteine und deren Molekulargewichte.

Protein	M [kDa]
Myoglobin	16,9
Carbonic Anhydrase	23,3
Enolase	44
BSA	66
Conalbumin	78

Tabelle 2.3: Die Proteine inkl. Molekulargewicht die für die Erstellung der Kalibrationsfunktion benutzt wurden

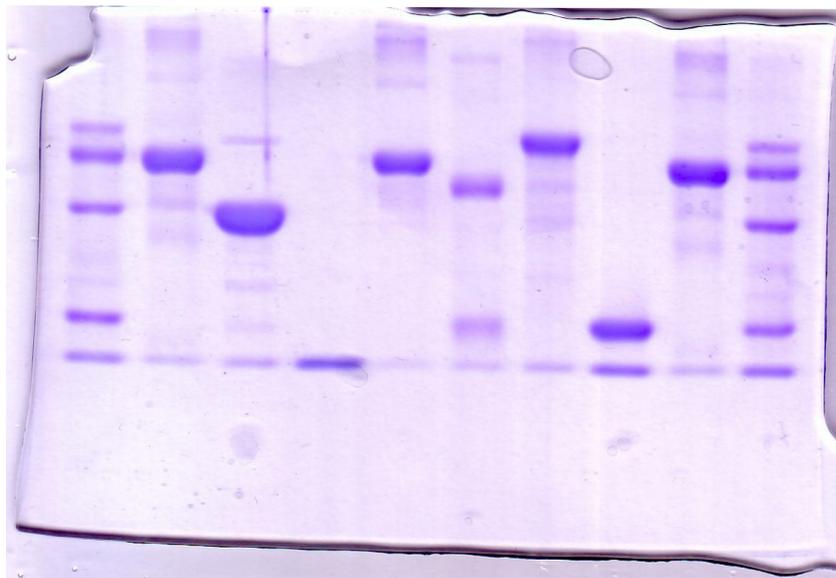


Abbildung 2.3: Ergebnis der SDS-PAGE Gel A

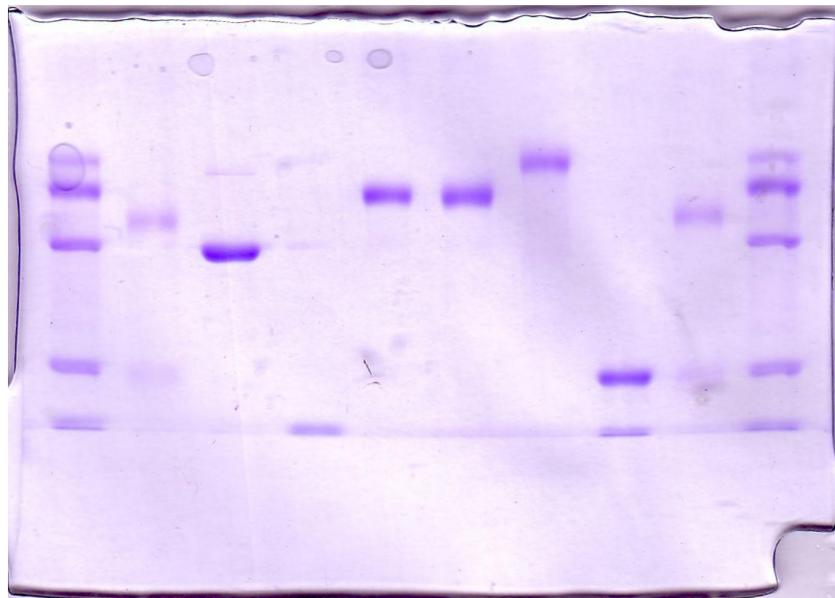


Abbildung 2.4: Ergebnis der SDS-PAGE Gel B

Abbildung 2.3 und 2.4 zeigen die Ergebnisse der Elektrophorese. Deutlich zu sehen ist, dass die Protein-Banden im Gel B (Abb. 2.4) viel schwächer blau gefärbt sind und auch kleiner sind, als die Proteinbanden in Gel A (Abb. 2.3). Dies lässt sich auf die verringerte Menge an Proteinlösungen die bei Gel B im Vergleich zu Gel A benutzt wurden zurückführen. In Gel B konnte nicht die gleiche Menge an Lösung aufgegeben werden, da nicht mehr als die aufgegebene Menge vorhanden war. Tabellen 2.4 und 2.5 geben Auskunft über die Proteinlösungsmengen, die aufgegeben wurden.

Position	aufgegebene Substanz	Volumen [μL]
1	Standardproteinmix	10
2	Probe A	10
3	Enolase	10
4	Myoglobin	10
5	BSA	10
6	Probe B	10
7	Conalbumin	10
8	Carbonic Anhydrase	10
9	Probe A	10
10	Standardproteinmix	10

Tabelle 2.4: Aufgegebene Proteinlösungen pro Tasche im Sammelgel A

Position	aufgegebene Substanz	Volumen [μL]
1	Standardproteinmix	5
2	Probe B	3
3	Enolase	3
4	Myoglobin	3
5	BSA	3
6	Probe A	3
7	Conalbumin	3
8	Carbonic Anhydrase	3
9	Probe B	3
10	Standardproteinmix	5

Tabelle 2.5: Aufgegebene Proteinlösungen pro Tasche im Sammelgel B

2.4.1 Kalibrierfunktion

Für die Erstellung der Kalibrierfunktion wurde der dekadische Logarithmus des Molekulargewichtes der Proteine gegen den R_f -Wert aufgetragen. Es zeigte sich, dass zwischen diesen beiden Werten ein sehr guter linearer Zusammenhang herrscht. Für die Bestimmung der R_f -Werte wurde der Abstand der Mitte der Proteinbande dividiert durch den Abstand einer nicht retardierten Substanz vom Sammelgel aus berechnet. Es wurde die Mitte der Proteinbande zur Bestimmung des Abstands herangezogen, da davon ausgegangen wird, dass die Banden ähnlich einem Peak in der Chromatographie entsprechen und daher die Mitte am besten für die Bestimmung geeignet ist.

Abbildung 2.5 zeigt die aufgetragenen Werte für das Gel A und die daraus resultierende Kalibrationsgerade.

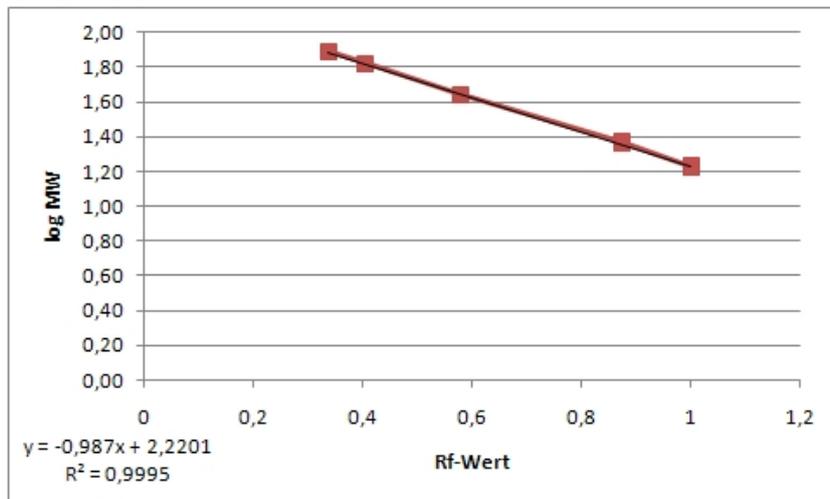


Abbildung 2.5: Die Kalibrationsgerade des Gels A

Die Kalibrationsfunktion lautet:

$$y = -0,987x + 2,2201$$

Auch für das Gel B wurde eine Kalibrationsfunktion erstellt. Abbildung 2.6 zeigt die aufgetragenen Werte.

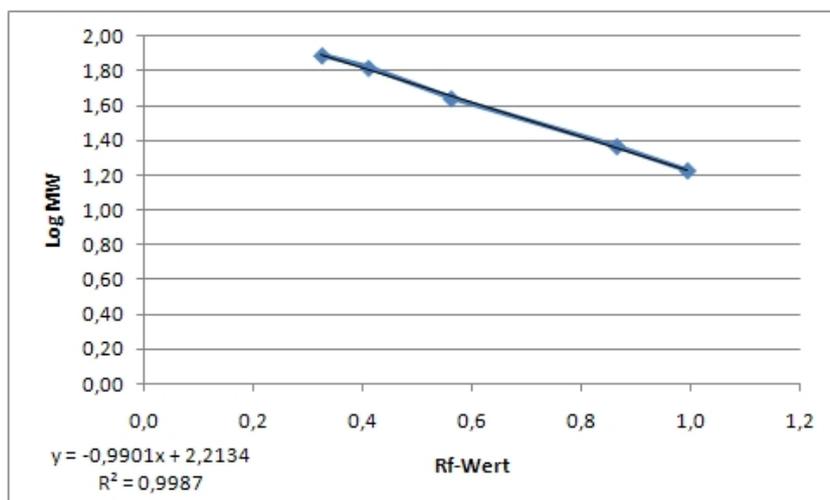


Abbildung 2.6: Die Kalibrationsgerade des Gels B

Die Kalibrationsfunktion lautet:

$$y = -0,9901x + 2,2134$$

2.4.2 Molekulargewichtsbestimmung

Mit Hilfe der im vorigen Schritt erstellen Kalibrationsfunktion wurde an Hand der R_f -Werte der Proben A und B deren Molekulargewicht bestimmt. Um zum Molekulargewicht der Proben zu gelangen muss man den R_f -Wert des Proteins für die Variable x einsetzen und anschließend muss das Ergebnis noch entlogarithmiert werden. Tabelle 2.6 gibt die Werte für die Berechnung an.

Proteinprobe	M [kDa]	Rf []
Probe A	65,7	0,4081
Probe B	58,0	0,4625

Tabelle 2.6: Bestimmtes Molekulargewicht der Proteinproben A und B aus Gel A

Für Gel B ergaben sich folgende Ergebnisse:

Proteinprobe	M [kDa]	Rf []
Probe A	65,7	0,4000
Probe B	56,8	0,4639

Tabelle 2.7: Bestimmtes Molekulargewicht der Proteinproben A und B aus Gel B

2.5 Zusammenfassung & Diskussion

In Gel B wurden jeweils viel kleinere Mengen an Standardproteinen als auch an Probe aufgetragen, da nicht mehr ausreichend Proteinlösungen zu Verfügung standen. Das erklärt auch die viel schwächere Färbung der Protein-Banden in Gel B im Vergleich zu Gel A. Dadurch sind aber auch schmälere Banden entstanden. Die Bestimmung der R_f -Werte erfolgte manuell aber Computer-Unterstützt indem die Abstände für die Bestimmung des R_f -Wertes mit einem Computerprogramm vermessen wurden. Durch die breiten Banden ergibt sich aber hier eine nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle. Ein Unterschied ob man am Anfang oder am Ende der Bande misst ergibt im Endeffekt einen Fehler des Molekulargewichts von 10 kDa, also einen nicht zu vernachlässigenden Wert. Um eine möglichst genaue Molekulargewichtsbestimmung zu ermöglichen, müssen daher möglichst enge und kontrastreiche Banden angestrebt werden.

Da die Aufgabemenge an Protein in Gel B geringer ist und vor allem nicht 100%ig genau, wurden im Endeffekt nur die Ergebnisse vom Gel A für das Endergebnis herangezogen.

Proteinprobe	MW [kDa]
Probe A	65,7
Probe B	58

Tabelle 2.8: Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung der Proteinproben A und B

Tabelle 2.8 fasst die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung der Probenproteine A und B zusammen.

Mit der hier durchgeführten Bestimmung ist eine Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen nur näherungsweise möglich. Dies stellt auch gleichzeitig den größten Nachteil der SDS-PAGE dar. Weiters ist der Aufwand für die Probenvorbereitung und für das Herstellen der Gele nicht unerheblich. Als Vorteil muss aber auf jeden Fall die einfache Bestimmung von mehreren Proteinen nebeneinander angeführt werden. Auch bietet die SDS-PAGE im Vergleich zu anderen Elektrophoreseverfahren den Vorteil, dass das Gel absolut inert gegenüber mikrobiellem Befall und gegen Abbau von Proteinen (z.B. Enzyme) ist.

Als Alternativen zur SDS-PAGE können die native PAGE sowie verschiedene Massenspektrometrische Verfahren erwähnt werden. Der große Nachteil der nativen PAGE ist, dass die Eigenladungen der Proteine bei der Trennung berücksichtigt werden und daher die Trennung nicht nur auf Grund des Molekulargewichtes respektive der Molekülgröße erfolgt. Die Massenspektrometrischen Verfahren sind deutlich genauer als die SDS-PAGE, jedoch vom apparativen Aufwand her deutlich höher, was sich in den Analysenkosten deutlich niederschlägt. So kann eine Analyse mittels MS bis zu dreifach so teuer sein wie mit SDS-PAGE ¹. Dafür erhält man bei der Massenspektroskopie gegebenenfalls auch Informationen über die Primärstruktur der Proteine.

¹<http://www.proteomefactory.de/qualitycontrol/qualitycotrol/qualitycotrol.html>