

Grundpraktikum Biowissenschaften für Bioinformatiker

Beginn : 6. März 2006

Versuch 4

Datei: V4 Protein-Elektrophorese Bioinformatik

Proteintrennung

Protein-Elektrophorese



Fachrichtung Biochemie

Prof. Dr. Rita Bernhardt Dr. Frank Hannemann

Kyung Hoon Hwang, MS

Versuch 4 : Protein-Elektrophorese

Inhalt

<i>1 Einführung</i>	<i>3</i>
<i>2 Diskontinuierliche Proteinelektrophorese im SDS – Polyacrylamidgel</i>	<i>4</i>
<i>3 Nachweis von Proteinen durch Färbung mit Coomassie – Brilliantblau</i>	<i>5</i>
<i>4 Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung</i>	<i>6</i>
<i>5 Proteomics und die 2D – Elektrophorese</i>	<i>7</i>
<i>6 Isoelektrische Fokussierung</i>	<i>7</i>
<i>7 Western – Blotting</i>	<i>10</i>
<i>8 Versuchsdurchführung und Auswertung</i>	<i>11</i>
<i>8.1 Versuchsdurchführung</i>	<i>11</i>
<i>8.2 Auswertung</i>	<i>12</i>
<i>9 Geräte, Substanzen und Lösungen</i>	<i>13</i>
<i>9.1 Geräte und Materialien</i>	<i>13</i>
<i>9.2 Lösungen</i>	<i>13</i>
<i>10 Literatur</i>	<i>15</i>
<i>11 Vorgesprächsthemen, Stichworte</i>	<i>15</i>

1 Einführung

Biochemische Untersuchungen setzen oft voraus, daß die verwendeten oder die zu analysierenden Stoffe, seien es Enzyme, Coenzyme oder Substrate, homogen sind. Das bedeutet, daß sie von nicht interessierenden Begleitsubstanzen abgetrennt werden müssen. Dazu sind Trennverfahren entwickelt worden und werden stetig weiterentwickelt. Biochemische Untersuchungen gelten nicht weniger oft der Frage, wie hoch der Gehalt einer Substanz in einem Gemisch ist, oder wie sich dieser Gehalt im Zuge einer Reaktion ändert. Auch dafür werden Trennverfahren eingesetzt und immer empfindlicher gestaltet.

Alle Trennverfahren beruhen auf separativem Transport, wobei der Mechanismus der Trennung auf Phasengleichgewichten beruhen kann, wie sie typischerweise bei chromatographischen Trennungen ausgenutzt werden, oder auf kinetischen Prozessen, wie sie uns bei elektrophoretischen Trennungen und bei der Zentrifugation begegnen. Natürlich zählen auch Fällungsverfahren, Filtration und Dialyse zu den verbreiteten Trennverfahren.

Während chromatographische Verfahren analytische wie präparative Anwendung finden, dienen elektrophoretische Verfahren ganz vorwiegend analytischen Zwecken und sind für die meisten Fragestellungen der Protein- und Nukleinsäureanalytik die Methoden der Wahl. Elektrophoretische Trennverfahren werden darüber hinaus auch für den Nachweis anderer geladener Teilchen benutzt.

Zahlreiche Biomoleküle tragen ionisierbare Gruppen und können deshalb in Lösung als Kationen oder Anionen vorliegen. Außerdem weisen Moleküle mit ähnlichen Ladungen aber unterschiedlicher relativer Molmasse verschiedene Ladungsdichten auf. Diese Eigenschaften bilden die Voraussetzung für die Wanderung solcher Ionen in einem elektrischen Feld (Prinzip der Elektrophorese).

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von positiv oder negativ geladenen Molekülen im elektrischen Feld in einer Lösung oder einer Trägermatrix. Unterwirft man eine Mischung von Proteinen einer Elektrophorese, kann man erwarten, daß die verschiedenen Proteine in schmalen einzelnen Banden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern, da die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins von der Molekülgröße und der Anzahl überschüssiger positiver bzw. negativer Ladungen auf der Moleküloberfläche abhängt. Besteht die Trägermatrix aus Gel (z.B. Stärke, Agarose oder Polyacryl) so spricht man von Gelelektrophorese. Die Wanderung von Makromolekülen in solchen Gelen wird zusätzlich von der Struktur des Gels beeinflusst. Die Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht schnelle Molekulargewicht-Bestimmungen. Unabhängig davon, welches Polymer als Matrix verwendet wird, kann der Vernetzungsgrad variiert und damit die Maschenweite der Gele der Größe der zu trennenden Moleküle angepaßt werden. Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid und der

Vernetzung der linearen Polymere durch N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Ammoniumperoxodisulfat (APS), das leicht Radikale bildet, initiiert. Als Katalysator dient dabei N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Die Acrylamidkonzentration im Polymerisations-Ansatz bestimmt die Länge der Polyacrylamidketten, die Bisacrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad. Beide zusammen bestimmen die Eigenschaften des Gels, insbesondere die Porengröße, Elastizität und Dichte. Je nach Größe der zu trennenden Moleküle verwendet man Gele unterschiedlicher Porosität: 2.5 %-Gele erlauben es, Moleküle mit einem Molekulargewicht im Bereich von 10^6 Dalton, 30 %-Gele solche mit einem Molekulargewicht im Bereich von 10^3 Dalton zu trennen.

Die Gelelektrophorese dient somit der Analyse von Makromolekülen (Proteinen oder Nukleinsäuren) und ermöglicht eine schnelle Molekulargewichtsbestimmung.

2 Diskontinuierliche Proteinelektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel

Die meisten Proteine verbinden sich mit der Seife SDS (**S**odium**d**odecyl**s**ulfat) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Masse/Ladungs-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1 % SDS-Lösungen). SDS denaturiert die Proteine, – besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol oder DTT (**D**ithio**t**hreit**o**l), – so daß sie ihre spezifische Quartär-, Tertiär- und zum Teil auch ihre Sekundärstruktur verlieren damit sie als Polypeptid vorliegen, und eine mehr oder weniger einheitliche Form annehmen. Während der Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol (Anode). Dabei trennt der Molekularsiebeffekt der Polyacrylmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Stokes-Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht auf. Es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der elektrophoretischen Mobilität des Polypeptids im Bereich von 10 bis 1000 kDa, je nach Konzentration des Trenngels. Für Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen bzw. Proteinuntereinheiten sind Proteinstandards als Eichsubstanzgemische kommerziell erhältlich.

Das am häufigsten verwendete SDS-Gelelektrophoresesystem ist das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern: Ein Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6.8, 3-4 % Acrylamid) überschichtet ein Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8.8, 5-20 % Acrylamid). Der Vorteil dieser Methode liegt in der höheren Trennschärfe und besseren Nachweisempfindlichkeit. Sie beruht auf der Diskontinuität der Gelstruktur und der unterschiedlichen Pufferzusammensetzung im Sammel- und im Trenngel. Das Sammelgel, in dem die Probe konzentriert wird, ist großporig, so daß ein Siebeffekt nicht zum Tragen kommt. Das Trenngel ist so engporig, daß ein Siebeffekt eintritt und die

Komponenten der Probe der Größe nach aufgetrennt werden. Die Probe, wie auch das Trenn- und Sammelgel enthält Chloridionen, während der Laufpuffer Glycinionen enthält.

Der Mechanismus der Konzentrierung beruht darauf, daß beim Anlegen der Spannung die Chloridionen im Gel mit hoher Mobilität zur Anode wandern, während die in das Sammelgel eindringenden Glycinionen aufgrund des neutralen pH-Wertes überwiegend als Zwitterionen vorliegen und deshalb nur sehr langsam wandern. Zwischen Glycin und Chloridionen entsteht eine an Ionen verarmte Zone. Die Proteine in der Probe sind negativ geladen und werden sich gemäß ihrer elektrophoretischen Mobilitäten zwischen den schnell wandernden Chloridionen und den langsam wandernden Glycin-Ionen anordnen. Dabei werden sie konzentriert, da sich zwischen den Leit- und Folgeionen ein Spannungsgradient aufbaut, der zur Beschleunigung der negativ geladenen Proteine führt, bis sie in Form von direkt aufeinanderfolgenden Stapel zum Leit-ion aufgeschlossen haben. Wenn die Ionenfront das Trenngel erreicht hat, wird Glycin aufgrund des veränderten pH-Wertes vollständig dissoziieren und die Proteine überholen, welche nun im engporigen Sammelgel dem Siebeffekt ausgesetzt sind und deshalb nach Größe aufgetrennt werden (vergleiche Abbildung 1). Zum Zwecke der 2D-Gelelektrophorese wird auf ein Sammelgel verzichtet.

3 Nachweis von Proteinen durch Färbung mit Coomassie –Brilliantblau

Nach der Auftrennung der Proteine ist es notwendig, die Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen, d.h. anzufärben. Vor oder während des Färbens werden die Proteine im Gel fixiert, also denaturiert und ausgefällt. Fixiert wird meistens mit Ethanol/Essigsäure/Wasser-Mischungen, die schon ein Färbemittel, z.B. Coomassie-Blau, enthalten.

Die Coomassie-Färbung ist einfach und macht wenig Arbeit, doch auch bei dünnen Gelen dauert das anschließende Entfärben 2-3 Stunden. Die Empfindlichkeit ist mäßig (200-400 ng Protein pro Bande), reicht jedoch für Routineprozeduren vollkommen aus. Zum Nachweis niedriger Proteinkonzentrationen empfiehlt sich die Silberfärbung. Diese Färbung hat eine höhere Empfindlichkeit (5-30 ng pro Bande), ist jedoch erheblich arbeits- und zeitaufwendiger.

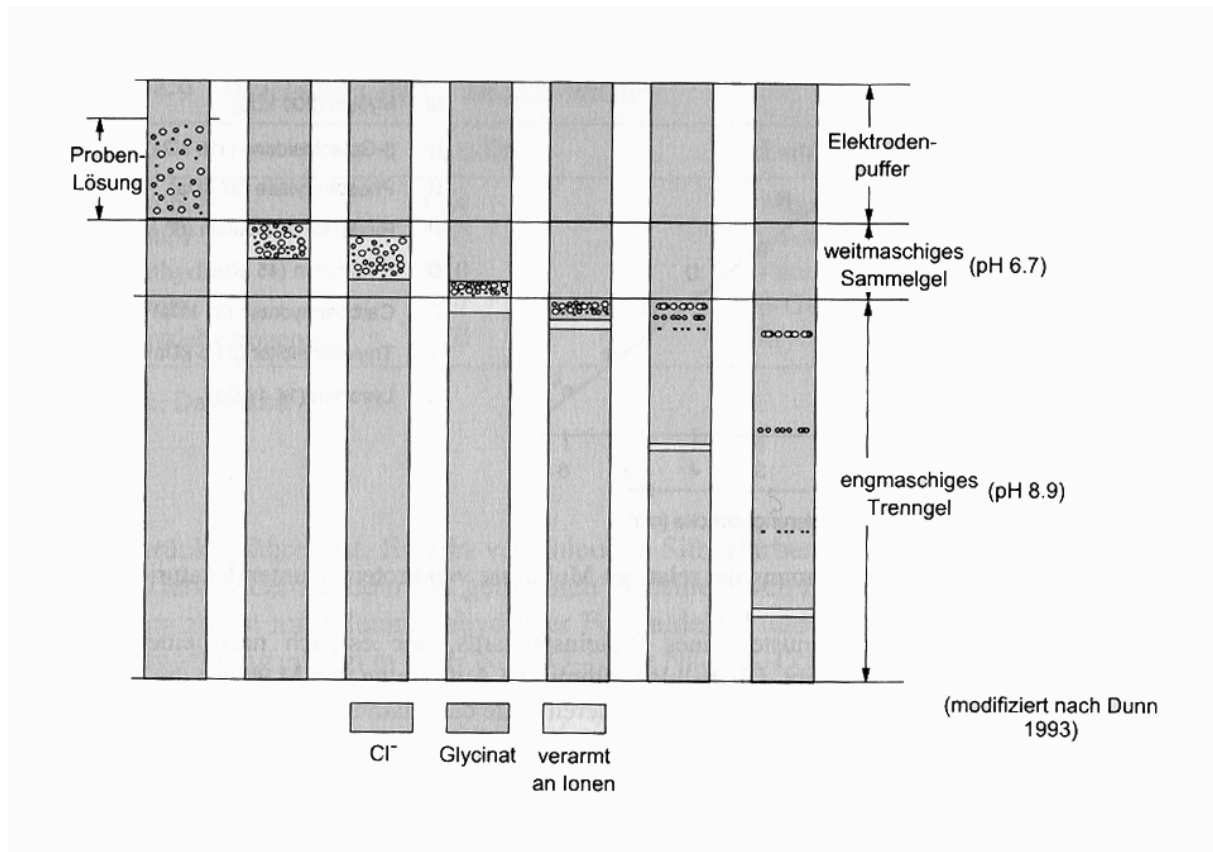


Abbildung 1 : Vorgänge bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese

4 Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag. Die Feinheiten dieser Reaktion sind unbekannt. Der Vorteil der Silberfärbung liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit, die Nachteile in der Umständlichkeit, der Dauer, der schwierigeren Reproduzierbarkeit und der fehlenden Quantifizierbarkeit, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben. Die Silberfärbung ist außerdem nicht spezifisch für Proteine, sondern färbt auch Nucleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide.

Es gibt ca. 50 Verfahren zur Silberfärbung, liegt, die sich in ihrer Sensitivität unterscheiden.

5 Proteomics und die 2D-Elektrophorese

Viele Funktionen unseres Körpers werden von Proteinen ausgeführt. Hierzu gehören z. B. die Enzyme, Strukturproteine und Antikörper. Die Baupläne für jedes dieser Proteine liegen in den Genen verschlüsselt. In den letzten Jahren hat man sich intensiv um die Entschlüsselung der Gesamtheit der Gene, des sogenannten Genoms, verschiedener Spezies bemüht (Genomics). Höhepunkt dieser Entwicklung ist die Aufklärung des Genoms des Menschen (Humanes Genomprojekt). Während die Genomwelle allmählich abebbt, ist bereits eine neue Welle im Entstehen: Proteomics. Hierbei geht es um die Aufklärung der Proteinmuster eines Organismus, da die Anzahl und Struktur der Proteine sehr viel komplexer als diejenige der Gene ist.

Unter „Proteomics“ versteht man die Analyse aller Proteine (Proteom) einer Zelle, eines Organismus oder einer biologischen Flüssigkeit. Es handelt sich um einen Prozeß, der eine streng kontrollierte Probenaufbereitung, die Technik der 2D-Elektrophorese, Analyse der Gele, Identifikation der Proteinspots und Datenbank-Recherchen umfaßt. Das Herzstück der „Proteomics“ ist die 2D-Elektrophorese. Bei dieser Technik werden die Proteine in zwei voneinander unabhängigen Schritten getrennt: in der 1. Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI), und in der 2. Dimension, einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE), nach ihrem Molekulargewicht (MW). Jeder Spot auf dem hierbei entstehenden Gel stellt ein bestimmtes Protein in der Probe dar. Es können Tausende von Proteinen getrennt und Informationen über ihren pI, ihr MW und ihre Menge in der Probe gewonnen werden. Die anschließende Identifikation der Proteine eröffnet viele verschiedene Möglichkeiten; im medizinischen Bereich beispielsweise die Entwicklung von speziellen Inhibitoren oder Arzneimitteln.

6 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung ist eine elektrophoretische Methode, mit der Proteine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes getrennt werden. Proteine sind Amphotere, d.h. ihre Nettoladung ist positiv, negativ oder gleich Null, jeweils in Abhängigkeit des pH-Wertes ihrer Umgebung. Die Nettoladung eines Proteins ist die Summe aller negativen und positiven Ladungen seiner Aminosäure-Seitenketten, sowie des Amino- und des Carboxy-Terminus. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins ist der spezifische pH-Wert, an dem seine Nettoladung Null beträgt. Proteine sind bei pH-Werten unterhalb ihres pI positiv und oberhalb ihres pI negativ geladen.

Die Anwesenheit eines pH-Gradienten ist Grundbedingung für die IEF-Technik. In einem pH-Gradienten, unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes, wird ein Protein zu der Position wandern, bei

welcher der Gradient den pH-Wert hat, der dem pI des Proteins entspricht, da das Protein dort die Nettoladung Null besitzt. Ein Protein mit einer positiven Nettoladung wird in Richtung der Kathode wandern, dabei nimmt seine positive Ladung mehr und mehr ab, bis es an der Stelle seines pI's angekommen ist. Das Gleiche gilt in umgekehrter Weise für negativ geladene Proteine. Würde ein Protein über seinen pI hinweg wandern, wechselte es die Nettoladung und würde dadurch gezwungen, zurückzuwandern. Durch diesen fokussierenden Effekt der IEF werden die Proteine an ihrem pI konzentriert. Die Proteine werden also auf der Basis von sehr geringen Ladungsunterschieden separiert.

Der Grad der Auflösung wird durch den Bereich des pH-Gradienten und die Stärke des elektrischen Feldes bestimmt. Um scharf fokussierte Banden zu erhalten, wird die IEF bei sehr hohen Spannungen durchgeführt (bis zu mehreren Tausend Volt). Unter denaturierenden Bedingungen wird die größtmögliche Auflösung erreicht. Vollständige Denaturierung und Solubilisierung wird durch eine Mischung von Harnstoff und Detergentien erreicht, womit sichergestellt wird, daß jedes Protein in nur einer Konfiguration vorliegt und Aggregation sowie intermolekulare Wechselwirkungen minimiert sind.

Die ursprüngliche Methode der isoelektrischen Fokussierung wurde mit pH-Gradienten in Polyacrylamidgelen durchgeführt, wobei der pH-Gradient durch sogenannte Träger-Ampholyte generiert wurde. Trägerampholyte sind kleine, lösliche, amphotere Moleküle mit einer hohen Pufferkapazität in der Nähe ihres eigenen pI's. Kommerziell erhältliche Trägerampholytmischungen bestehen aus hunderten verschiedener Polymerspezies, deren pI's einen weiten pH-Bereich überspannen. Legt man ein elektrisches Feld an eine solche Mischung (sogenannte Präfokussierung), so wandern die Ampholyte mit dem niedrigsten pI gegen die Anode, diejenigen mit dem höchsten pI gegen die Kathode. Die anderen Ampholyte ordnen sich zwischen den beiden Extremen entsprechend ihrem pI an und puffern so ihre Umgebung auf den jeweiligen pH-Wert. Das Ergebnis ist ein kontinuierlicher pH-Gradient.

Eine Alternative zu Trägerampholyten stellen die sogenannten immobilisierten pH-Gradienten (IPG) dar. Ein immobilisierter pH-Gradient wird durch die kovalente Bindung saurer und basischer Puffergruppen an ein Polyacrylamidgel während des Gießprozesses hergestellt. Diese Puffersubstanzen, sogenannte Acrylamido-Puffer, bestehen aus einem Set gut charakterisierter Moleküle, jedes mit einer einzelnen sauren oder basischen Gruppe ausgestattet, welche an ein Acryl-Monomer gebunden vorliegt. Immobilisierte pH-Gradienten werden aus 2 Lösungen gegossen: Eine beinhaltet eine relativ saure Mischung von Acrylamidopuffern, die andere besteht aus einer relativ basischen Mischung. Die Konzentration der verschiedenen Puffer in den zwei Lösungen bestimmt den Bereich und die Form des produzierten pH-Gradienten.

Immobilisierte Gradienten-Gele haben im Vergleich zu Gelen aus Trägerampholyten den Vorteil, daß sie eine einfachere Handhabbarkeit und eine höhere Reproduzierbarkeit bieten.

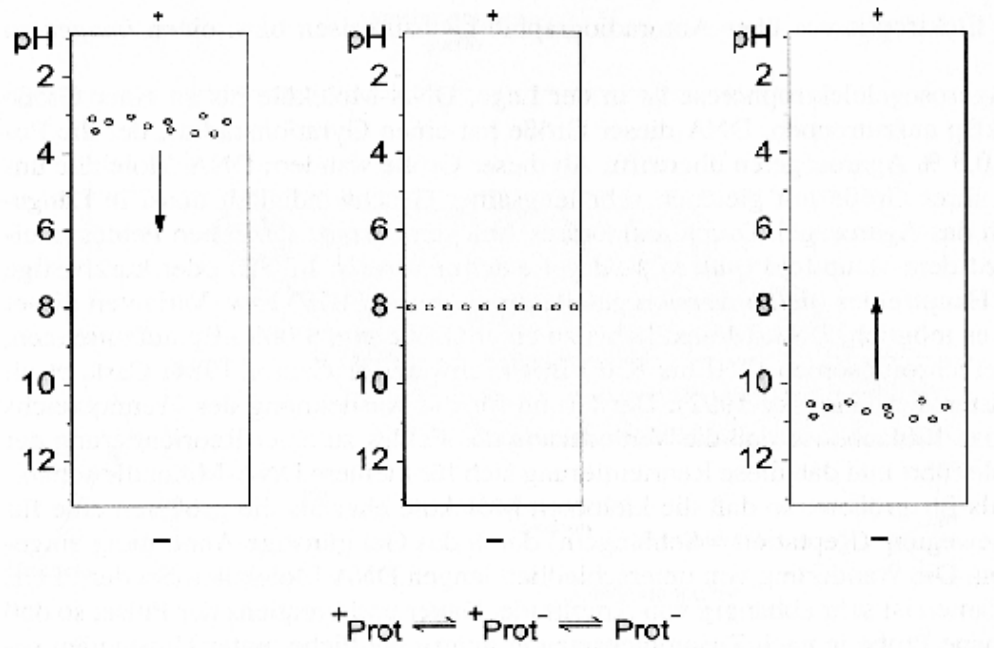


Abbildung 2 : Wanderung eines amphoteren Moleküls bei der Isoelektrischen Fokussierung

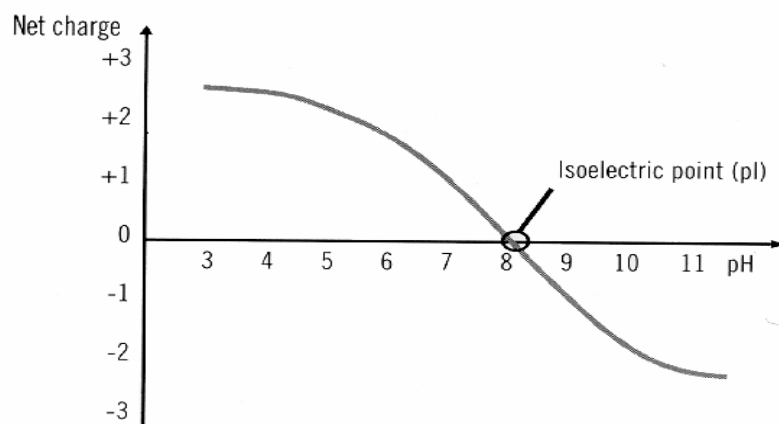
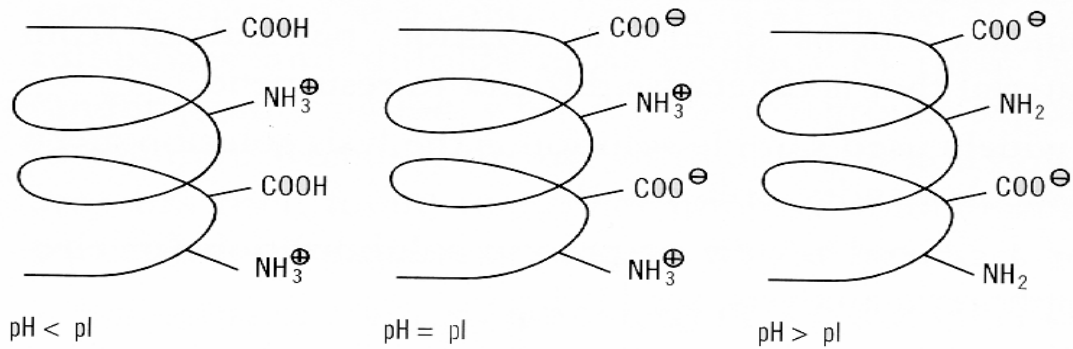


Abbildung 3 : Nettoladung eines Proteins versus pH der Umgebung: Die resultierende Kurve schneidet die Abszisse am isoelektrischen Punkt des Proteins.

7 Western-Blotting

Geringe Mengen eines bestimmten Proteins in einer Zelle oder Körperflüssigkeit lassen sich mit einer immunologischen Technik nachweisen, die Western-Blotting genannt wird.

Beim Blotten werden die Proteine eines SDS-Gels oder eines nativen Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen.

Der Blot ist das vielseitigste und beliebteste Werkzeug des Proteinbiochemikers, denn auf dem Blot kann ein Protein anfärbt, ansequenziert werden bzw. mit Antikörpern reagiert, mit Enzymen umgesetzt bzw. seine derivatisiert werden (Phosphatgruppen? Zuckerreste?) und auf die Bindung von Liganden und Ionen geprüft werden. Im Vergleich zum Gel ist die Membran leicht handzuhaben, und Reaktionen und Waschvorgänge laufen, unbehindert durch Diffusionsprobleme, schneller ab.

Blot-membranen bestehen aus Nitrocellulose, Polyvinylidendifluorid(PVDF), positiv geladenem Nylon oder aus mit Polybren beschichteten Glasfasern. Die Membranen binden die Proteine durch hydrophobe (Nitrocellulose) oder hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Selbst Peptide mit nur 20 Aminosäuren haften noch auf Nitrocellulose.

Die beliebten Nitrocellulosemembranen besitzen eine hohe Proteinbindungskapazität und eignen sich für Proteinfärbung, Immunfärbung, Lektinfärbung oder Ca^{2+} -Färbung. Ihre chemische Unbeständigkeit verbietet den Einsatz für Aminosäureanalysen und Sequenzierungen, und im trockenen Zustand sind die Membranen brüchig und leichtentzündlich.

Proteine binden nichtkovalent an Blotmembranen. Man kann also das geblottete Protein wieder von der Membran herunterholen, um es z.B. proteolytisch zu verdauen oder im MALDI-TOF zu analysieren.

Blocken:

Vor der Reaktion eines Blots mit Antikörpern, Lektinen oder Proteinliganden werden die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit einem Blocker (BSA, entfettetes Milchpulver, fetales Kälberserum, Tween 20, Gelatine etc.) abgesättigt.

Immunfärbung:

Geblootete Antigene lassen sich mit Antikörpern anfärben. Der geblockte Blot wird zuerst mit anti-Antigen-Antikörper (1. Antikörper) inkubiert. Danach wäscht man ungebundenen anti-Antigen-Antikörper weg und inkubiert den Blot mit einem markierten Antikörper (2. Antikörper). Dieser bindet an den anti-Antigen-Antikörper. Nach weiterem Waschen wird der Blot mit Hilfe der Markierung des 2. Antikörpers entwickelt und damit die Position des Antigens sichtbar.

8 Versuchsdurchführung und Auswertung

8.1 Versuchsdurchführung

- Kammer und Platten für die Multigießkammer mit Spüli und Schwamm säubern und mit ausreichend $H_2O_{\text{dest.}}$ spülen und trocknen.
- Glasplatten und Aluminiumoxidplatten mit Spacern trennen und in die Gießkammer legen (Glasplatten nach vorne), Gießkammer mit Glasplatten auffüllen und mit Klemmen schließen.
- Trenngel und Sammelgel in jeweils einem Falcongefäß vorbereiten und alles bis auf APS und TEMED hinzugeben.

Trenngel (0,375M Tris/Cl, pH 8.8) 15%ig

4 x Puffer Trenngel (LT)	5 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung	10 ml
10 % APS	100 μ l
TEMED	10 μ l
$H_2O_{\text{dest.}}$	ad 20 ml

angegebene Mengen sind ausreichend für 3 kleine Gele.

Sammelgel (0,125M Tris/Cl, pH6,8) 5%ig

4 x Puffer Sammelgel (UT)	2,5 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung	1,6 ml
10 % APS	50 μ l
TEMED	5 μ l
$H_2O_{\text{dest.}}$	ad 10 ml

- sind die Platten vorbereitet, gibt man APS und TEMED zur Trenngellösung und pipettiert das Trenngel in die Kammer, bis etwa 4 cm unter der Oberkante der Glasplatte.
- Überschichten mit 1 ml Isopropanol/Wasser (50/50)-Gemisch.
- Etwa 30 Minuten warten, bis das Gel auspolymerisiert ist (sieht man auch am Rest des Gels im Falcon). Ist das Gel polymerisiert, Isopropanol/Wasser-gemisch abschütten.
- TEMED und APS zum Sammelgel pipettieren, in die Kammer auf das Trenngel pipettieren und direkt den Kamm einfügen. Auspolymerisieren lassen.
- Elektrophoresekammer zusammenbauen.

- Die Multigießkammer auseinanderbauen, das Gelsandwich (mit Aluminiumoxidplatte , Spacern und Glasplatte) in die Elektrophoresekammer einspannen und auf Dichtigkeit überprüfen.
- Kammer mit Laufpuffer befüllen, Geltaschen mit Filzstift markieren (alternativ Schablone passend auflegen) und den Kamm vorsichtig aus dem Gel herausziehen.
- Die Proben mit SDS-Gel-Ladepuffer und gegebenenfalls mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnen (die Proben sollten zwischen 2-3 μg Protein pro Bande haben), danach 5 min im Wasserbad kochen. Kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugieren.
- Mit einer Mikropipette Proben und Proteinstandard in die Taschen des Gels auftragen.
- Deckel der Elektrophoresekammer schließen, Wasserkühlung anschließen, an Netzgerät anschließen und Netzgerät auf 10 mA einstellen.
- Ist die Front des Farbmärkers an dem unteren Ende des Gels angelangt, wird die Kammer abgebaut, das Gelsandwich vorsichtig auseinandergebaut. Eventuell das Gel durch Abschneiden einer Ecke markieren.
- Das Gel wird vorsichtig in ein Bad mit der Coomassie-Färbelösung gegeben und etwa 30 min auf dem Taumelschüttler gefärbt.
- Die Färbelösung wird wieder zurück in die Vorratsflasche gefüllt (Handschuhe!) und das Gel vorsichtig mit Wasser abgespült. Das Gel wird dann im Entfärbabad entfärbt (Entfärbelösung mehrmals wechseln, Entfärbelösung wird über Aktivkohlefilter regeneriert).
- Gel kurzzeitig in Wasser aufbewahren, und dokumentieren, später im Gelrockner trocknen.

8.2 Auswertung

Das Gel wird dokumentiert, die Molekulargewichte der Proteine anhand des Proteinstandards abgeschätzt und mit den theoretischen Werten verglichen.

9 Geräte, Substanzen und Lösungen

9.1 Geräte und Materialien

Minigel Vertikal –Einheit mit Glasplatten, Kämmen, Spacern, Klammern und Pufferkammer

Netzgerät

Multi-Gelgießkammer

5 ml-, 1 ml-, 200 µl-, 10 µl- Pipetten und passende Spitzen

2 Falcon-Gefäße à 50 ml

Wasserbad und Schwimmer

9.2 Lösungen

4 X Trenngelpuffer (LT)

1.5 M Tris/CL, pH 8.8

0.4 % SDS

4 X Sammelgelpuffer (UT)

0.5 M Tris/Cl, pH 6.8

0.4 % SDS

SDS Gelladepuffer (2 x)

1 M Tris/Cl, pH 6.8 1 ml

20 % SDS 2.0 ml

Glycerin 4.0 ml

0.1 % Bromphenolblau 0.2 ml

β-Mercaptoethanol 0.8 ml

H₂O_{dest} 2.0 ml

Laufpuffer (5 x)

Tris 15.1 g

Glycin 94.0 g

20 % SDS 25 ml

H₂O_{dest} ad 1000 ml

Coomassie Färbelösung

0.1 % Brilliant Blue 1.0 g

50 % Methanol 500 ml

10 % Essigsäure 100 ml

H₂O_{dest} ad 1000 ml, filtrieren

Coomassie Entfärbe-Lösung

10 % Methanol	100 ml
10 % Essigsäure	100 ml
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)

30 % Acrylamid/Bisacrylamid

TEMED

Isopropanol /Wasser-Gemisch (50/50; v/v)

Proben, Proteinstandards

10 Literatur

- COOPER, T.C. (1977): Biochemische Arbeitsmethoden. - Wiley Verlag, New York
- DUNN, M.J. (1993): Gel Elektrophoresis: Proteins. – BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- KLEBER, H.-P., SCHLEE, D. und SCHÖPP, W. (1997): Biochemisches Praktikum. - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. - Nature **227**: 680-685
- LOTTSPREICH, F.; ZORBAS, H. (1998): Bioanalytik.-Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- PINGOUD, A. URBANKE, C. (1997): Arbeitsmethoden der Biochemie. – De Gruyter, Berlin
- REHM, H. (1997): Der Experimentator: Proteinbiochemie. – Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- STRYER, L. (1994): Biochemie. - Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. Kapitel 3

11 Vorgesprächsthemen – Stichworte

Prinzipien der Auftrennung von Proteinen
Physikalische Grundlagen der Elektrophorese
Methoden der Elektrophorese

Literaturhinweis fürs Vorgespräch :

STRYER: BIOCHEMIE

LOTTSPREICH: BIOANALYTIK