

# 1

## **Elektrophorese**

### **1.1**

#### **Allgemeines**

##### **1.1.1**

###### **Elektrophoresen in freier Lösung**

*Wandernde-Grenzschichten-Elektrophorese:* Für die elektrophoretische Trennung von Substanzen entwickelte Arne Tiselius die Methode der wandernden Grenzschichtenelektrophorese und erhielt dafür, neben seinen Arbeiten auf dem Gebiet der Adsorptionsanalyse, 1948 den Nobelpreis (Tiselius, 1937). In ein mit Puffer gefülltes, U-förmiges Glasrohr, in dessen Enden die Elektroden eingebaut sind, wird die Probe, z. B. ein Proteingemisch, eingebracht. Unter dem Einfluss des elektrischen Feldes wandern die Probenkomponenten je nach Ladungszahl und Ladungsrichtung unterschiedlich schnell in Richtung Anode oder Kathode. Mithilfe einer Schlierenoptik kann man an beiden Enden der Probenzone die dabei entstehenden, durch unterschiedliche Lichtbrechung voneinander abgesetzten Grenzschichten während der Bewegung beobachten (Abb. 1.1).

Die Auflösung ist relativ gering, weil die meisten Zonen, außer den jeweiligen Frontzonen, Mischzonen sind. Die Grenzschichtenelektrophorese in freier Lösung wird heute hauptsächlich in der Grundlagenforschung zur exakten Messung von elektrophoretischen Mobilitäten von Substanzen eingesetzt.

*Kontinuierliche trägerfreie Elektrophorese:* Bei dieser von Hannig (1982) entwickelten Methode fließt senkrecht zu einem elektrischen Feld ein kontinuierlicher Pufferfilm durch einen 0,5–0,2 mm schmalen Spalt zwischen zwei gekühlten Glas- oder Kunststoffplatten (*Free-Flow-System*). An der einen Seite wird an einer definierten Stelle die Probe zugeführt, am anderen Ende werden die Einzelfraktionen durch eine Reihe von Schläuchen aufgefangen. Die verschiedenen elektrophoretischen Mobilitäten senkrecht zur Fließrichtung führen zu verschiedenen starker, aber konstanter Ablenkung der Probenkomponenten, sodass sie an unterschiedlichen Stellen am Ende der Trennkammer auftreffen (siehe Abb. 1.2). Neueste Entwicklungen ermöglichen Feldstärken von über 800 V/cm und Trennungen in weniger als 1 min.

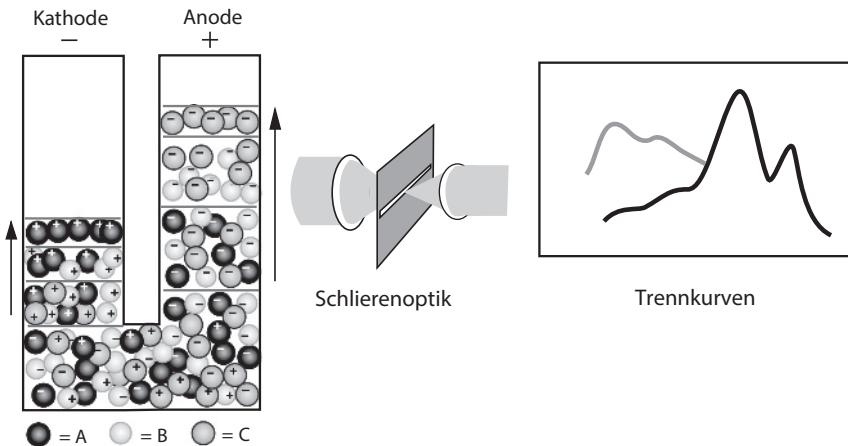


Abb. 1.1 Wandernde-Grenzschichten-Elektrophorese in einem U-Rohr nach Tisellius. Messung der elektrophoretischen Mobilität mit Schlierenoptik.

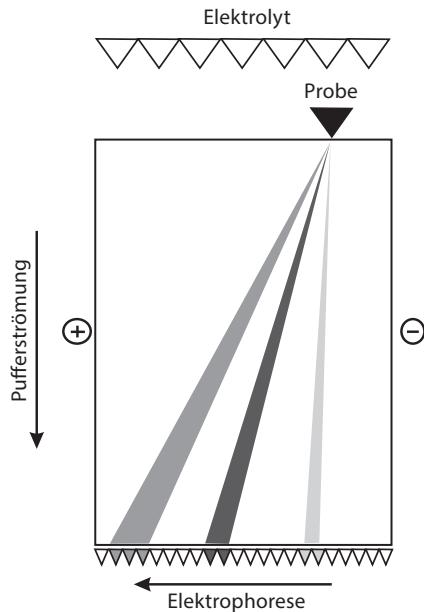


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der kontinuierlichen trägerfreien Elektrophorese (*Free-Flow-System*).

Neben Trennungen löslicher Substanzen wird diese Technik auch zur Identifizierung, Reinigung und Isolierung von Zellorganellen und -membranen und ganzer Zellen, wie Erythrozyten, Leukozyten, Gewebezellen, Malariaerreger und anderer Parasiten, eingesetzt. Die Methode ist sehr effektiv, da bereits geringe

Unterschiede der Oberflächenladungen von Partikeln und Zellen zur Trennung ausgenutzt werden können.

**Kapillarelektrophorese:** Für analytische und mikropräparative Elektrophoresen ist die Kapillarelektrophorese eine interessante Alternative (Hjertén, 1983): Analog zur HPLC wird sie häufig als HPCE (*High Performance Capillary Electrophoresis*) bezeichnet. Die Trennung erfolgt in einer 20–30 cm langen, meist offenen Quarzkapillare aus *Fused Silica* mit 50–100 µm Innendurchmesser; die beiden Enden tauchen in Pufferbehälter ein, in welche die Elektroden eingebaut sind. Die verwendeten Feldstärken liegen in der Größenordnung bis zu 1 kV/cm, die Stromstärke beträgt 10–20 µA; man benötigt deshalb einen Stromversorger, der Spannungen bis zu 30 kV liefern kann. Die joulesche Wärme kann aus diesen dünnen Kapillaren mit einem Gebläse sehr effektiv abgeführt werden. Typische Trennzeiten sind 10–20 min. Die Detektion der Fraktionen erfolgt durch UV-Messung direkt in der Kapillare bei 280, 260 oder in manchen Fällen sogar bei 185 nm. Bei einigen Substanzen erreicht man Nachweisempfindlichkeiten bis in den Attomolbereich. Zur Verhinderung von Adsorption der Probenkomponenten an der Kapillaroberfläche und zur Vermeidung von Elektroosmoseeffekten wird die Kapillareninnenseite meist mit linearem Polyacrylamid oder Methylcellulose belegt. Kapillarelektrophorese-Apparaturen können für alle drei Trennmethoden eingesetzt werden: Elektrophorese, Isotachophorese und Isoelektrische Fokussierung. Die verwendeten Puffer hängen vom Trennproblem ab: z. B. 20–30 mmol/L Natriumphosphatpuffer pH 2,6 für die Elektrophorese von Peptiden.

**Mizellare elektrokinetische Chromatografie** (MEKC) eingeführt von Terabe *et al.* (1984) ist eine elektrophoretische Methode, mit welcher man sowohl neutral als auch geladene Substanzen auftrennen kann. Hierbei werden Tenside über der kritischen Mizellenkonzentration eingesetzt. Die geladenen Mizellen wandern in die Gegenrichtung des vom Quarzglas verursachten elektroosmotischen Flusses. Die elektroosmotische Strömung ist schneller als die Wanderung der Mizellen, welche mit den Probensubstanzen hydrophobisch und elektrostatisch interagieren wie bei einer Chromatografie.

Ein Vorteil der Kapillarelektrophorese liegt in der Automatisierung. So gehört bei solchen Geräten eine automatische Probenaufgabe zum Standard (Abb. 1.3). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Kopplung mit anderen analytischen Instrumenten sowohl vor der Elektrophorese: HPLC/HPCE; als auch danach: HPCE/Massenspektrometer. Für präparative Trennungen verwendet man hinter dem UV-Detektor einen Fraktionensammler. Im Gegensatz zur *Reversed-Phase-Chromatographie* werden Proteine bei der HPCE nicht geschädigt, außerdem erhält man eine höhere Auflösung. Einzelne Fraktionen können deshalb auch innerhalb der Kapillare mit Antikörpern detektiert und identifiziert werden (siehe Kapitel 7, Blotting-Methoden).

Praktische Informationen zur Kapillarelektrophorese findet man in dem von Robert Weinberger (2000) herausgegebenen Buch.

Wegen der Automatisierungsmöglichkeit, der Parallelisierung für Hochdurchsatzanalysen und der Wiederverwendbarkeit der Kapillaren wurde die Kapillarelektrophorese die zentrale Methode zur DNA-Sequenzierung und damit

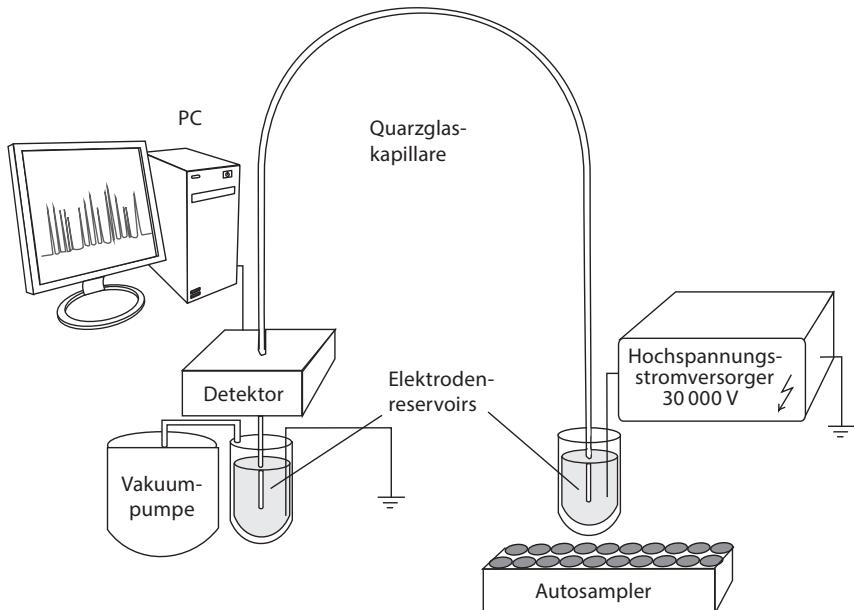


Abb. 1.3 Schematische Darstellung eines Kapillarelektrophoresesystems.

zur Entzifferung von Genomen. Seitdem *Next-Generation-Genome-Sequencing*-Methoden eingeführt worden sind, welche nicht mehr auf Elektrophorese basieren, werden die Multikapillarsysteme für andere Applikationen eingesetzt, vor allem für automatisierte Hochdurchsatzanalysen komplexer Zuckerstrukturen (Schwarzer *et al.*, 2008).

Allerdings ist die Investition für ein trägerfreies Elektrophoresesystem oder ein Kapillarelektrophoresegerät deutlich höher als für eine Gelelektrophoreseausstattung.

*Mikrochipelektrophorese* (MCE) ist im Prinzip eine miniaturisierte Kapillarelektrophorese in einer planaren Anordnung. Sie ermöglicht einen höheren Grad der Automatisierung und noch schneller Analysen. Probenaufgabe und -trennung erfolgt in schmalen Kanälen, welche durch fotolithografische Prozeduren in die Oberfläche von Glas-, Silikon- oder Polymerplättchen eingeätzt wurden. Meist sind die Kanäle in der Form eines Kreuzes angeordnet in der Größenordnung von 1–10 cm mit ca. 50 µm Durchmesser (siehe Abb. 1.4). Alle Reservoirs enthalten Elektroden für Probeninjektion und die Trennung. Das Probenvolumen für die MCE im Vergleich zur CE beträgt ein Zehntel: ca. 0,1–0,5 nL, und wird meistens elektrokinetisch appliziert. Bei Spannungen von 1–4 kV sind die Trennungen etwa viermal schneller als in der CE: 50–200 s. Die Visualisierung der Zonen erfolgt entweder durch laserinduzierte Fluoreszenz (LIF), wie in der Publikation von Schulze *et al.* (2010) beschrieben, oder mit elektrochemischer Detektion. Letztere Methode eignet sich am besten zur Detektion von niedermolekularen Analyten.

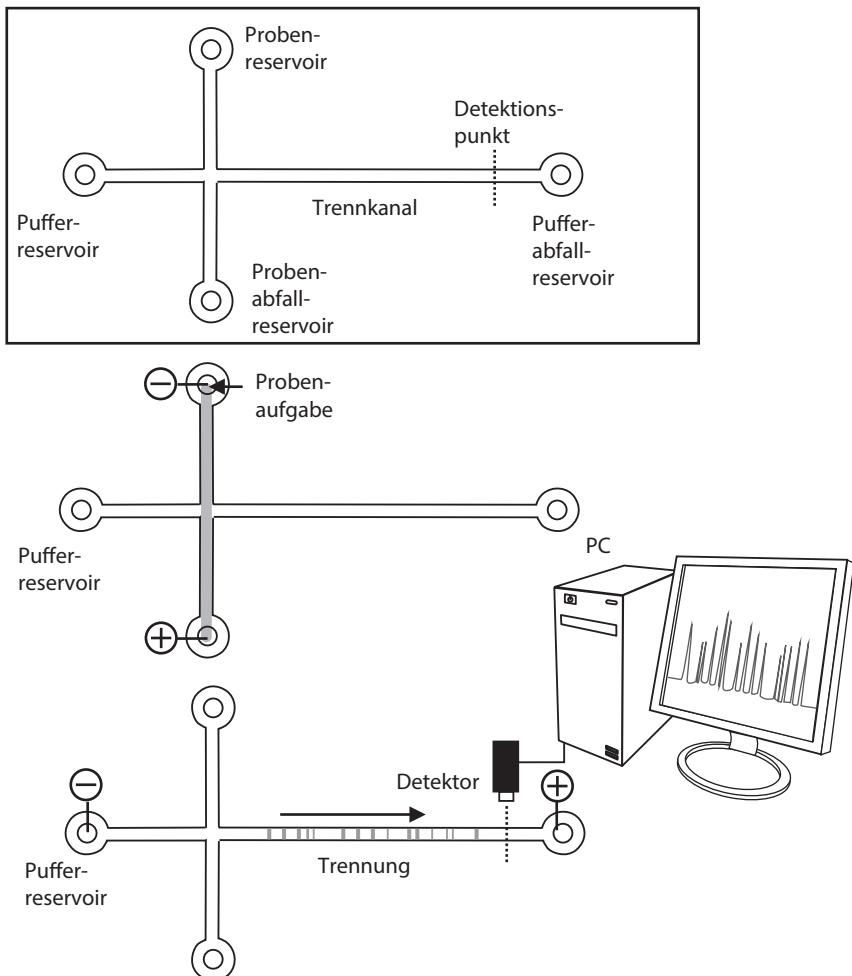


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Mikrochipelektrophorese.

### 1.1.2

#### Elektrophoresen in stabilisierenden Medien

Stabilisierende Medien können aus Papier oder Folien bestehen, meist werden aber Gele verwendet. Um den Verlauf der Trennung beobachten zu können und den Endpunkt der Trennung zu erkennen, lässt man Farbstoffe mit hohen elektrophoretischen Mobilitäten mit der Probe mitlaufen: Bei Proteintrennung in Richtung Anode verwendet man meist Bromphenolblau oder Orange G, in Richtung Kathode Bromkresolgrün oder Methylenblau, für Nukleinsäuretrennungen Xylencyanol.

Die Arbeitsanleitungen im zweiten Teil beschränken sich auf Elektrophoresen im stabilisierenden Medium, weil diese Techniken mit dem geringsten Geräteaufwand durchgeführt werden können.

Der Nachweis der getrennten Zonen erfolgt entweder unmittelbar im Trennmedium durch Anfärben, Ansprühen mit spezifischen Reagenzien, durch Enzym-Substrat-Kopplungsreaktionen, Immunpräzipitation, Autoradiografie, Fluorografie oder mittelbar durch *Immunprinting* oder mit *Blotting*-Methoden.

*Papier-* und Dünnschichtelektrophorese: Diese Techniken sind zum großen Teil aufgrund der besseren Trenneigenschaften und der höheren Beladungskapazität von Agarose- und Polyacrylamidgelen durch Methoden der Gelelektronphorese abgelöst worden. Lediglich zur Analyse von hochmolekularen Polysacchariden und Lipopolysacchariden, welche die Gelporen verstopfen können, werden elektrophoretische Trennungen auf horizontalen Kieselgeldünnschichtplatten durchgeführt, die seitlich mit Puffertanks verbunden sind (Scherz, 1990).

*Celluloseacetatfolien* sind großporig, sodass sie keine Siebwirkung auf Proteine ausüben. Elektrophoretische Trennungen in diesem Material sind deshalb rein ladungsbabhängig. Die Matrix wirkt kaum der Diffusion entgegen, die getrennten Zonen sind relativ breit, die Auflösung und die Nachweisempfindlichkeit sind relativ niedrig. Auf der anderen Seite ist ihre Handhabung sehr einfach, Trennung und Anfärben funktionieren schnell (Kohn, 1957). Dafür werden einfach konstruierte Horizontalkammern verwendet: Die Celluloseacetatstreifen werden in die Kammern eingehängt, sodass die beiden Enden in die Pufferlösung eintauchen; eine Kühlung während der Trennung ist überflüssig. Diese Technik ist weitverbreitet in der klinischen Routine und verwandten Anwendungsgebieten für die Untersuchung von Serum und zur Analyse von Isoenzymen in physiologischen Flüssigkeiten. Informationen zur Elektrophorese in der klinischen Diagnostik sind im Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik zu finden (Gressner und Arndt, 2013).

### 1.1.3

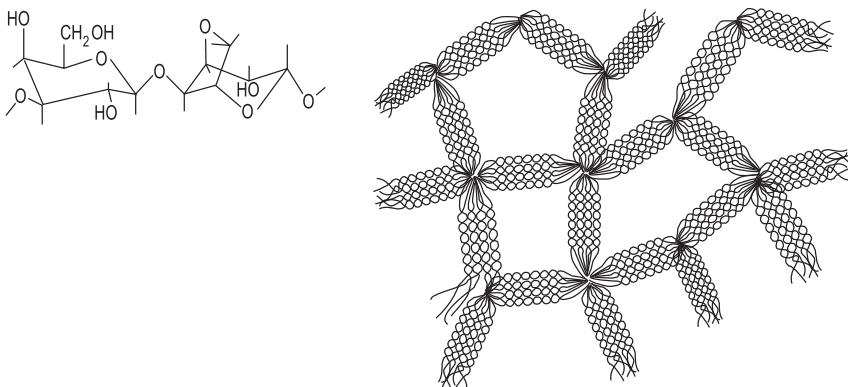
#### Gelelektronphorese

##### 1.1.3.1 Geltypen

Die Gelmatrix soll möglichst kontrolliert einstellbare und gleichmäßige Porengrößen haben, chemisch inert sein und keine Elektroosmose besitzen.

*Stärkegele*, von Smithies (1955) eingeführt, werden aus hydrolysiertem Kartoffelstärke hergestellt, die man durch Aufkochen löst und in 5–10 mm dicker Schicht ausgießt. Die Porengröße wird durch den Stärkegehalt der Lösung eingestellt. Stärke ist ein Naturprodukt, dessen Eigenschaften stark variieren können. Wegen der mangelnden Reproduzierbarkeit und der unpraktischen Handhabung diese Gele werden sie immer mehr von Polyacrylamidgelen abgelöst.

*Dextrangele* sind fast ausschließlich für präparative Anwendungen ohne Siebeffekte verwendet worden, wie für die Isoelektrische Fokussierung (Radola, 1975).



**Abb. 1.5** Chemische Formel der Agarose und Ausbildung der Gelstruktur beim Gelingen.

*Agarosegele* werden insbesondere dann verwendet, wenn man große Poren für Analysen von Molekülen über 10 nm Durchmesser benötigt. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Durch Entfernen des Agaropektins erhält man unterschiedliche Elektroosmose- und Reinheitsstufen. Die Charakterisierung erfolgt durch die Schmelztemperatur (35–95 °C) und den Grad der Elektroosmose ( $m_r$  Wert), welcher der Anzahl polarer Restgruppen abhängt. Die Porengröße ist abhängig von der Agarosekonzentration: Man orientiert sich dabei an der Einwaage der Agarose und dem Wasservolumen. Da die beim Aufkochen unvermeidlichen Wasserdampfverluste von Ansatz zu Ansatz variieren können, kann dieser Wert in der Praxis nicht als absolut exakt betrachtet werden. In der Regel verwendet man Gele mit 150 nm Porengröße bei 1 % (g/v) bis 500 nm bei 0,16 %. Agarose wird durch Aufkochen in Wasser gelöst und geliert beim Abkühlen. Dabei bilden sich aus dem Polysaccharid-Sol Doppelhelices aus, die sich in Gruppen seitlich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern (Abb. 1.5). Diese Struktur verleiht Agarosegele hohe Stabilität bei großen Poredurchmessern.

Die Gele werden in der Regel durch Ausgießen der Agaroselösung auf eine horizontale Glasplatte oder Trägerfolie hergestellt. Die Geldicke ergibt sich dabei aus dem Volumen der Lösung und der Fläche, auf die sie verteilt wird.

Für DNA-Elektrophoresen gießt man 1–10 mm dicke Gele auf UV-durchlässige Kunststoffplatten, weil die DNA-Fraktionen mit Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden. Die Gele befinden sich während der Elektrophorese unter einer Pufferschicht, damit sie nicht wegen der Elektroendosmose austrocknen (siehe Abb. 1.11 und 1.18).

Für Proteinelektrophoresen werden 1–2 mm dünne Agarosegelschichten auf horizontale Glasplatten oder Trägerfilme aufgebracht. Sehr exakte Geldicken erreicht man durch Gießen der Lösung in vorgewärmte Küvetten, wie z. B. bei der vertikalen SDS-Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse von Multimeren des von Willebrand-Faktors (Ott *et al.*, 2010).

*Polyacrylamidgele*, erstmals 1959 von Raymond und Weintraub (1959) für die Elektrophorese eingesetzt, sind chemisch und mechanisch besonders stabil

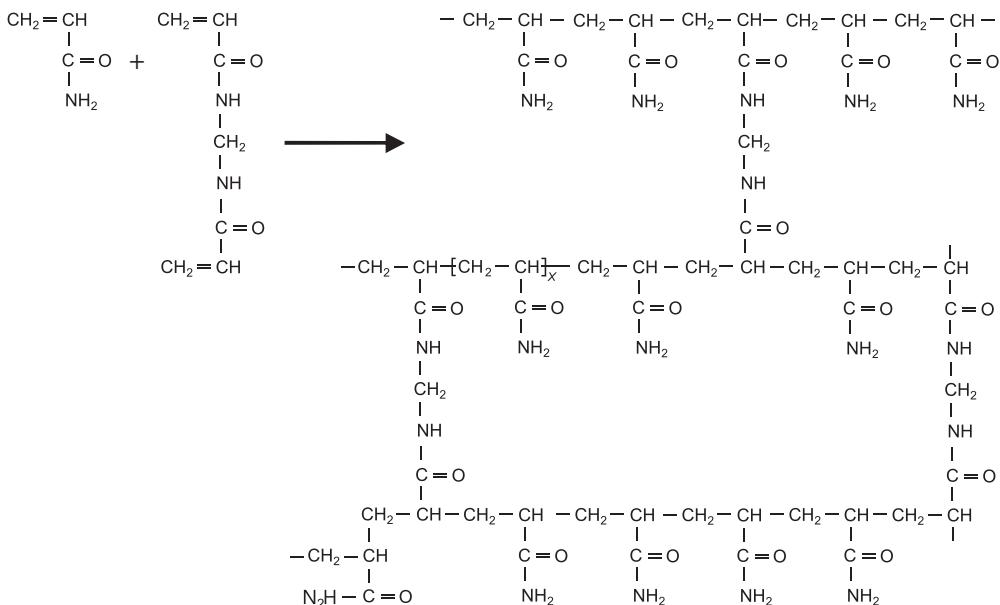


Abb. 1.6 Die Polymerisation von Acrylamid und Methylenbisacrylamid.

und vollkommen transparent. Durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer – meist *N,N'*-Methylenbisacrylamid (Abb. 1.6) – erhält man ein klares, durchsichtiges Gel mit sehr geringer Elektroendosmose. Die Reaktion wird mit Ammoniumpersulfat als Katalysator gestartet, TEMED liefert die tertiären Aminogruppen, welche die Freisetzung von Radikalen auslösen.

Die Porengröße lässt sich durch die Totalacrylamidkonzentration  $T$  und den Vernetzungsgrad  $C$  (von engl. *cross-linking*) exakt und reproduzierbar einstellen, wobei am häufigsten die Definition nach Hjertén (1962) verwendet wird:

$$T = \frac{a + b}{V} \times 100 (\%) ; \quad C = \frac{b}{a + b} \times 100 (\%) .$$

Dabei ist  $a$  – Masse Acrylamid in g,  $b$  – Masse Methylenbisacrylamid in g,  $V$  – Volumen in mL.

Bei konstantem  $C$  und steigendem  $T$  wird die Porengröße kleiner. Bei konstantem  $T$  und steigendem  $C$  folgt die Porengröße einer parabolischen Funktion: Bei hohen *und* niedrigen  $C$ -Werten erhält man große Poren, das Minimum bei 10 %  $T$  Gelen liegt bei  $C = 4\%$ . Gele mit  $C \gg 5\%$  sind spröde und relativ hydrophob. Sie werden nur in Sonderfällen verwendet, wie z. B. zur Trennung von Megaproteinkomplexen (Strecker *et al.*, 2010). Für Trennungen von Proteinen und Peptiden sollte man keine  $T$ -Werte über 16 % verwenden, weil die Moleküle während der Wanderung chemisch modifiziert werden. Die Peptidgele von Schägger und von Jagow (1987) bestehen aus 16 %  $T$  und 6 %  $C$ .

Neben Methylenbisacrylamid (Bis) gibt es noch eine Reihe von alternativen Vernetzern, die von Righetti (1983) aufgelistet und verglichen wurden. Erwähnt sei an dieser Stelle das *N,N'*-Bisacryloylcystamin, das eine Disulfidbrücke enthält, die mit Thiolreagenzien aufgespalten werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, nach der Elektrophorese die Gelmatrix zu verflüssigen und großporig zu machen. Die alternativen Vernetzer werden relativ selten verwendet, weil die Trennqualität der Gele meist schlechter ist als mit Bis.

### **Wichtig**

Die Monomere sind toxisch: Vorsichtig damit umgehen!

Die Polymerisation erfolgt unter Luftabschluss, da Sauerstoff ein Radikalfänger ist. Die Polymerisationskinetik ist u. a. temperaturabhängig: Zur Vermeidung von unvollständiger Polymerisation soll diese nicht bei Temperaturen unter 20 °C erfolgen. Es ist wichtig zu wissen, dass die Gele gleich nach der Verfestigung noch nicht fertig polymerisiert sind. Für den vollständigen Einbau der Vernetzer sollte man das Gel noch einige Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen und nicht sofort in den Kühlraum oder Kühlschrank legen. Die Gele sollten frühestens einen Tag nach der Polymerisation verwendet werden.

Die Gele werden zur Minimierung der Sauerstoffaufnahme in vertikalen Gießständen polymerisiert: Rundgele in Glasröhrchen, Flachgele in Küvetten, die durch zwei Glasplatten und Dichtungen gebildet werden. Die Oberfläche der Monomerlösung wird mit wassergesättigtem Butanol oder mit 70 Vol-% Isopropanol in Wasser überschichtet. Alternativ hierzu kann man die Monomerlösung mit ca. 7 % Glycerin beschweren und dann mit Wasser überschichten. Neben der vertikalen gibt es auch horizontale Gießtechniken (Radola, 1980). Die erhöhte Sauerstoffaufnahme muss durch Erhöhung der Katalysatorenmenge kompensiert werden. Dabei handelt man sich allerdings Störungen bei der Trennung ein.

Die Geleigenschaften werden durch zahlreiche Parameter beeinflusst:

- Die beste Polymerisationseffektivität erhält man bei einem pH-Wert von 7.
- Gele mit sauren Puffern müssen mit alternativen Katalysatoren polymerisiert werden, z. B. mit einer Kombination aus Ascorbinsäure, FeSO<sub>4</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jordan und Raymond, 1969).
- Die Qualität der Monomere und aller anderen Reagenzien spielt eine wichtige Rolle. Wenn Teile von Acrylamid zu Acrylsäure zerfallen sind, enthält das Gel fixierte Carboxylgruppen, die dann Elektroendosmoseerscheinungen verursachen.
- Einige Pufferkomponenten können die Polymerisation inhibieren; z. B. dürfen die Puffer keine Thiole enthalten.

### **Wichtig**

Monomere in Pulverform sind besonders gesundheitsschädigend. Deshalb wird empfohlen, lieber fertige Stammlösungen zu verwenden, als Acrylamid und Bis selbst einzuwiegen.

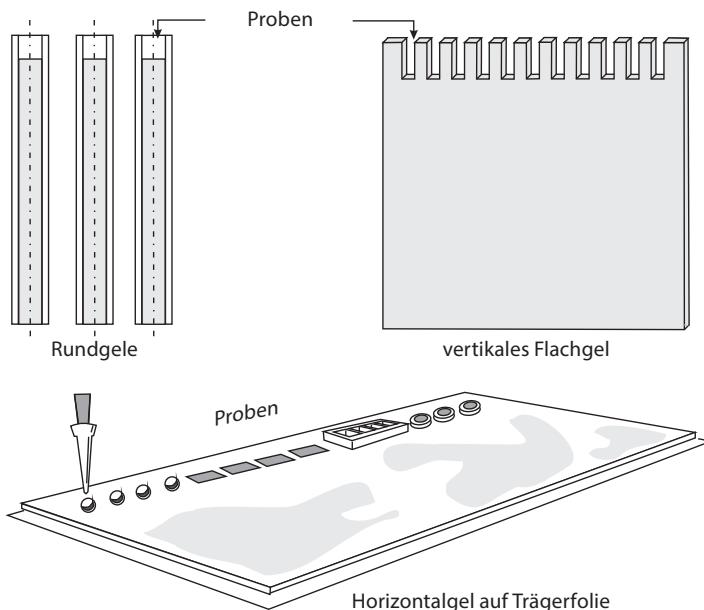


Abb. 1.7 Gelgeometrien für elektrophoretische Trennungen.

Der Zusatz von Gelverstärkern wie Rhinohide und Duracryl zu Monomerlösungen verbessern die mechanischen Eigenschaften der Gele und erleichtern die Handhabung von großen Flachgelen ohne Trägerfolie. Unglücklicherweise sind aber von Einflüssen auf das Trennverhalten und Färbeeigenschaften berichtet worden.

Polyacrylamidgele werden in der Form vertikaler Gelstäbe oder -platten verwendet oder als horizontale Gelschichten, wobei Letztere der einfachen Handhabung wegen meist auf stabile Trägerfolien aufpolymerisiert sind (Abb. 1.7).

Die Verwendung von Rundgelen ist selten geworden, weil sie schwierig zu handhaben und die Resultate schwer zu vergleichen sind. Bei Vertikalsystemen werden die Gele zur Elektrophorese zusammen mit den Glasröhrchen bzw. den Glasküvetten in die Pufferkammern eingesetzt; die Gele haben unmittelbaren Kontakt zu den Elektrodenpuffern. Wenn, z. B. für das Picken von Proteinspots, Gele mit stabiler Größe benötigt werden, kann man das Gel kovalent an eine Glasplatte binden, indem man diese vorher mit Bind-Silan beschichtet. Gele für Horizontalsysteme werden auf eine Trägerfolie aufpolymerisiert und zur Trennung aus der Gießküvette entnommen.

Für die Aufgabe der Proben werden an der Oberseite von Vertikalgele Proben-taschen einpolymerisiert (siehe auch Abb. 1.7). Dies erreicht man durch Einsticken eines scharfkantigen Kamms zwischen die Glasplatten. Bei Horizontalgelen benötigt man in vielen Fällen keine Geltaschen; die Proben werden mit Filterpapierstückchen oder Lochbändern aus Silikongummi direkt auf die Oberfläche ap-

pliziert. Bei homogenen Puffersystemen sind auch im Horizontalsystem schmale Probenwannen in der Geloberfläche wichtig für gute Resultate.

### 1.1.3.2 Instrumentelles zur Gelelektrophorese

Die apparative Ausrüstung für die Kapillar- und Mikrochipelektrophorese sowie die automatisierte DNA-Sequenzierung ist bereits im Zusammenhang mit den Methoden beschrieben worden.

Die Ausrüstung für Elektrophoresen besteht prinzipiell aus drei Geräten:

- a) Stromversorger,
- b) Kühl- oder Heizthermostat,
- c) Trennkammer mit zugehörigem Gelgießsystem.

Zu a): Für Elektrophoresen benötigt man Gleichstromversorger, die, bei exakt einstellbaren Strom-, Spannungs- und Leistungswerten, hohe Spannungen liefern.

Zu b): Viele selbst hergestellte Trennsysteme werden ohne Kühlung bzw. Heizung eingesetzt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass mit gekühlten oder thermostatisierten Apparaturen bessere und reproduzierbarere Trennergebnisse erzielt werden.

Zu c): Das Herzstück der Elektrophoreseausstattung ist die Trennkammer. Hier gibt es wegen der Vielzahl unterschiedlicher Methoden und Modifikationen eine Reihe von Typen.

### 1.1.3.3 Elektrische Bedingungen

Für die Festlegung der Trennbedingungen bei Elektrophoresen sollte man sich noch einige physikalische Zusammenhänge vor Augen führen. Dies ist auch wichtig für das Arbeiten nach exakten Vorschriften:

Die treibende Kraft bei der Elektrophorese ist das Produkt aus der Eigenladung  $Q^\pm$  (Nettoladung) einer Substanz und der elektrischen Feldstärke  $E$ , die in V/cm gemessen wird. Das bedeutet für die Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  einer Substanz in cm/s:

Die Nettoladung  $Q^\pm$  kann als Summe der positiven und negativen Elementarladungen betrachtet werden, gemessen in Amperesekunden.

$$v = \frac{\Theta^\pm \times E}{R}$$

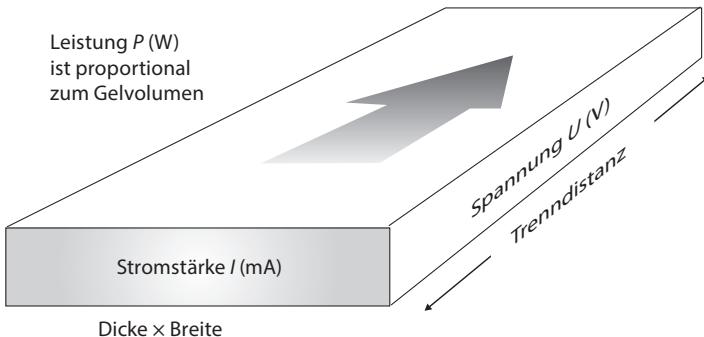
Für eine elektrophoretische Wanderung benötigt man also eine bestimmte Feldstärke.

Die Reibungskonstante  $R$  ist abhängig vom Molekülradius  $r$  (Stokes-Radius) in cm und der Viskosität  $\eta$  des Trennmediums, welche in N s/cm<sup>2</sup> gemessen wird.

Zur Erreichung der Feldstärke muss die Spannung  $U$  anliegen: sie wird in Volt (V) gemessen, die Trenndistanz entsprechend in cm:

$$\text{Spannung} = \text{Feldstärke} \times \text{Trenndistanz}$$

$$U = E \times d$$



**Abb. 1.8** Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Dimensionen des Trennmediums und Strom-, Spannungs- und Leistungsbedingungen bei Elektrophoresen.

Legt man an ein leitendes Medium (Puffer) ein elektrisches Feld an, so fließt ein Strom  $I$ ; er wird in Ampere (A) gemessen, doch gibt man ihn in der Elektrophorese meist in mA an. Die Höhe des Stromflusses ist abhängig von der Ionenstärke des Puffers. Bei Elektrophoresen hat man relativ hohen Stromfluss, bei der Isoelektrischen Fokussierung ist er gering, weil pH-Gradienten relativ niedrige Leitfähigkeit haben.

Das Produkt aus Spannung und Strom ist die Leistung  $P$ , die in Watt (W) angegeben wird.

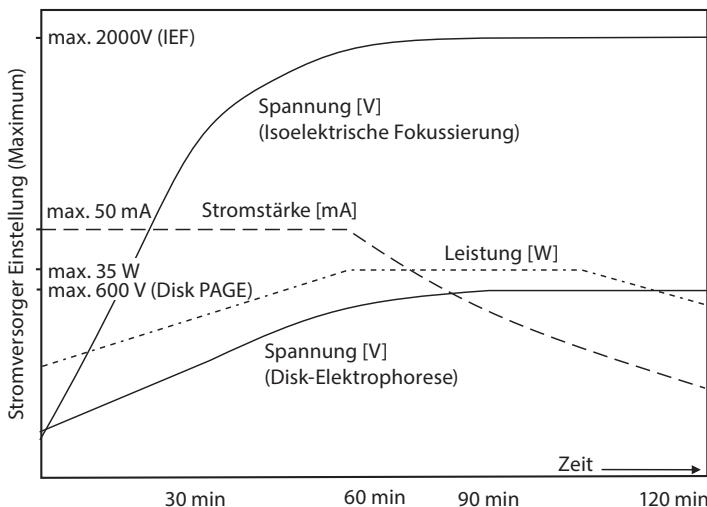
$$\text{Leistung} = \text{Spannung} \times \text{Strom}$$

$$P = U \times I$$

Das Produkt aus (elektrischer) Leistung und Zeit ist Energie. In der Elektrophorese wird die elektrische Energie im Wesentlichen in joulesche Wärme umgewandelt. Deshalb werden Elektrophoresen meist gekühlt. Da die Kühlleffektivität, die Wärmeabfuhr, nicht unendlich gesteigert werden kann, darf eine gewisse Leistung nicht überschritten werden. Bei Nichtbeachtung dieser Fakten kann ein Gel ohne Weiteres durchbrennen.

In Gelplatten kann der „Smiling-Effekt“ auftreten, wenn mehr joulesche Wärme erzeugt wird als abgeführt werden kann: dann ist die Temperatur innerhalb des Gels höher als an den beiden Rändern. Dadurch sind die elektrophoretischen Mobilitäten im Inneren höher als am Rand und die Front und die getrennten Zonen sind an den beiden Seiten nach oben gebogen. Wenn ein relativ dickes Flachgel an einer Oberfläche stärker gekühlt wird als an der anderen, entsteht der „Jalousieneffekt“: Die Zonen wandern an einer Oberfläche schneller als an der anderen.

Abbildung 1.8 zeigt die Zusammenhänge zwischen Spannung, Strom und Leistung mit den Dimensionen des Elektrophoresemediums. Je länger die Trenndistanz, umso höher muss die Spannung sein, um eine gewisse Feldstärke zu erreichen. Die Stromstärke ist, bei gegebener Ionenstärke, proportional zum Querschnitt: Je dicker also das Gel ist, desto mehr Strom fließt. Die Leistung ist proportional zum Volumen.



**Abb. 1.9** Verlauf der elektrischen Parameter während einer Disk-Elektrophorese und einer Isoelektrischen Fokussierung.

Richtwerte für gekühlte 0,5 mm dünne Horizontalgele:

Zonenelektrophoresen: ca. 2 W/mL Gelvolumen

IEF: ca. 1 W/mL Gelvolumen

Dies hat auch zur Konsequenz, dass man Leistung und Stromstärke reduzieren muss, wenn man nur Teile eines ganzen Gels laufen lässt, z. B.:

*Halbes Gel: halbe Stromstärke – halbe Leistung – gleiche Spannung ... bei gleicher Trenndistanz*

Wenn zwei Vertikalgele statt einem laufen gelassen werden, werden die Stromstärke – und auch die Leistung – verdoppelt:

*Zwei Gele: doppelte Stromstärke – doppelte Leistung – gleiche Spannung ... bei gleicher Trenndistanz*

Die eingestellten Werte am Stromversorger sind immer die Maximalwerte. Die wirklichen Werte ändern sich während des Laufes, weil sich die Leitfähigkeit ändert. Oft wird vergessen, dass ein höher konzentriertes Gel einen höheren Widerstand hat als ein Gel mit niedrigem  $T$ -Wert.

Die Leitfähigkeit des Systems ändert sich sehr stark bei der Disk-Elektrophorese und der Isoelektrischen Fokussierung (siehe Abb. 1.9). Zur Optimierung der Trennbedingungen und Vermeidung von Überhitzung des Gels sollte man unbedingt einen Stromversorger mit Leistungsbegrenzung einsetzen (bei manchen Stromversorgern kann man nur die Strom- und Spannungswerte begrenzen).

## 1.1.4

**Stromversorger**

Es gibt verschiedene Ausführungs- und Spezifikationsstufen:

- Einfache Stromversorger können nur über die Spannung geregelt werden; meist bis maximal 200 V.
- Typische Elektrophoresestromversorger kann man mit konstanter Stromstärke oder konstanter Spannung betreiben; meist bis 500 oder 1000 V, 200 oder 400 mA.
- Hochspannungsstromversorger, die auch für die Isoelektrische Fokussierung geeignet sind, liefern hohe Spannungen bis zu 3000 V und sind zusätzlich leistungsstabilisiert; d. h., man kann eine Maximallistung einstellen.
- Programmierbare Stromversorger haben zusätzlich einen Mikroprozessor, über den man verschiedene Trennbedingungen mit unterschiedlichen Stufen abrufen kann. Sie enthalten meistens auch einen Volt-Stunden-Integrator.

## 1.1.5

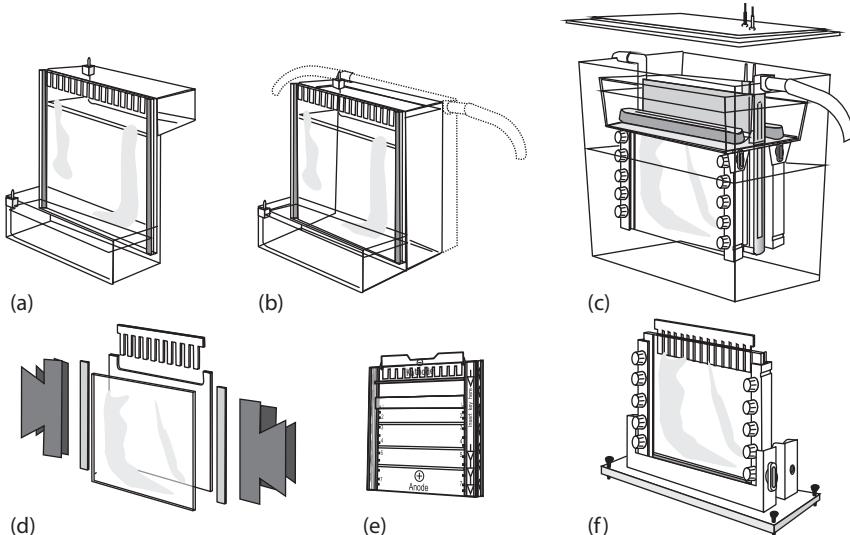
**Trennkammern****1.1.5.1 Vertikalapparaturen**

Die Elektrophorese erfolgt dabei meist in vertikalen Gelplatten, die in Glasküvetten eingegossen sind. Die Proben werden auf die Geloberfläche in die Geltaschen mit einer Spritze oder Mikropipette aufgegeben. Die Stromzufuhr erfolgt über Platinelektroden, die in die Puffertanks eintauchen.

Einige Ausführungsbeispiele von Vertikalsystemen mit und ohne Kühlmöglichkeiten sind in Abb. 1.10 gezeigt. Zur Abführung der jouleschen Wärme wird in Beispiel b der „obere Puffer“, in Beispiel c der untere Puffer über Wärmetauscher gekühlt. Wegen der unterschiedlichen Arten der Verbindungen des Gels mit dem oberen Puffertank werden unterschiedliche Formen von Glasplatten eingesetzt. Einfache Kassetten für selbst gegossene Gele sind früher erst mit Agarose an der unteren Öffnung abgedichtet worden, bevor sie mit der Acrylamidmonomerlösung gefüllt wurden. Neuere Gießstände verwenden weiche Gummiplatten für die Abdichtung (f). Fertiggele werden meist in Plastikkassetten geliefert (e).

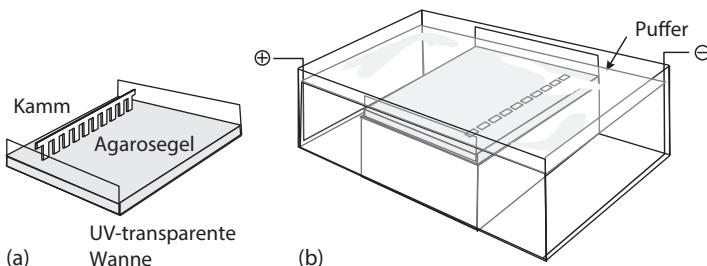
**1.1.5.2 Horizontalapparaturen****DNA-Analysen in Agarosegelen**

Zur analytischen und präparativen Auf trennung von DNA-Bruchstücken und RNA-Restriktionsfragmenten werden meistens *Submarine*-Kammern verwendet. Bei diesen Horizontalkammern (siehe Abb. 1.11) liegt das Agarosetrenngel unter einer dünnen Pufferschicht zwischen den seitlich angeordneten Puffertanks. Solche einfachen Horizontalkammern gibt es in verschiedenen Größen.



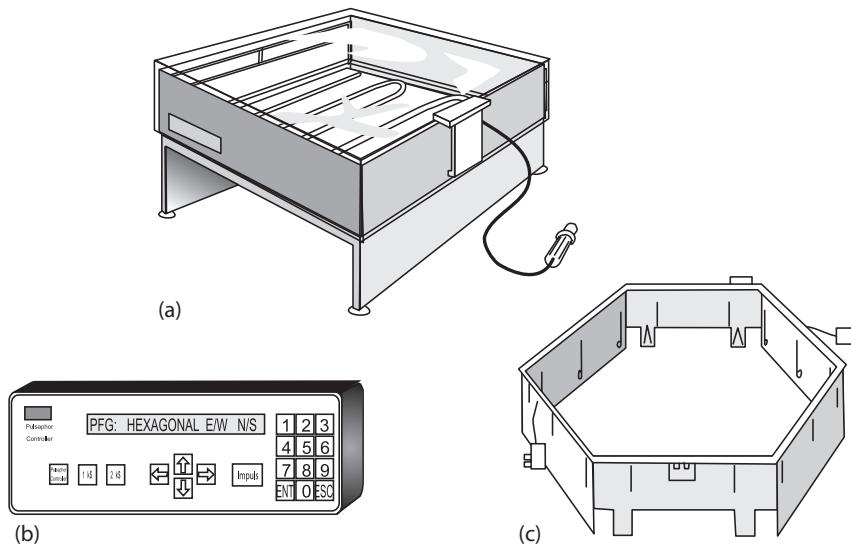
**Abb. 1.10** Unterschiedliche Konstruktionen von Vertikalkammersystemen. (a) Einfache ungekühlte Vorrichtung mit oberem und unterem Pufferreservoir. (b) Konstruktion mit großem „oberen“ Puffertank, der auch als Wärmeausgleich dient; optional mit Wasser kühbar über Schläuche. (c) System mit großem unteren Puffertank der ebenfalls als Wärme-

ausgleich dient; optional mit Wasser kühbar über Schläuche. (d) Kassettenaufbau für die Systeme A und B mit einer Glasplatte mit eingeriebener Aussparung. (e) Plastikkassette mit Fertigigel. (f) Gießstand mit Kassette für das System C mit zwei Glasplatten mit glatten Oberkanten.



**Abb. 1.11** Submarine-Kammer für Nukleinsäuretrennungen. (a) Gießwanne; (b) Agarosekammer während der Elektrophorese.

Zur Elektrophorese im *gepulsten elektrischen Feld* wird an den Stromversorger ein Steuergerät angeschlossen, das alternierend – mit einprogrammierten Zeittakten – die Elektroden in Nord-Süd- und Ost-West-Richtung ansteuert. In die Elektroden sind Dioden eingebaut, damit die nicht eingeschalteten Elektroden das Feld nicht beeinflussen können. Da solche Trennungen sehr lange dauern können – bis zu mehreren Tagen –, muss der Puffer gekühlt und umgewälzt werden (Abb. 1.12). Um inhomogene elektrische Felder zu erzeugen, werden die Punktelektroden auf rechtwinklig angeordnete Elektrodenschienen aufgesetzt.

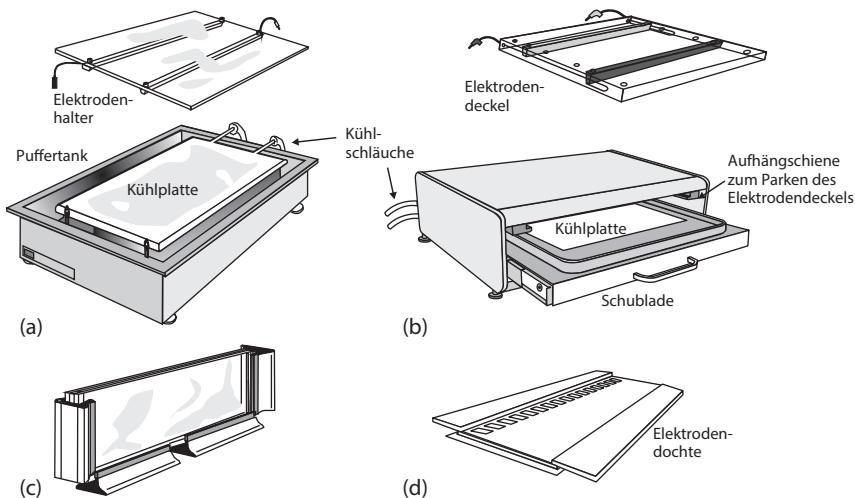


**Abb. 1.12** System für die DNA-Gelelektrophorese im gepulsten Feld (PFG). (a) PFG-Submarine-Trennkammer mit Kühlslange und Pufferzirkulationspumpe (nicht gezeigt). (b) Programmierbares Pulsssteuergerät. (c) Hexagonalelektrode zum Geradeauslauf der Trennspuren.

#### Protein- und DNA-Fragment-Analysen in horizontalen Polyacrylamidgelen

Sehr vielseitig sind *Horizontalkammern* mit Kühlthermostatisierplatte, teilweise mit seitlich angeordneten Puffertanks (siehe Abb. 1.13). Sie sind ausgerüstet für die analytische und präparative Isoelektrische Fokussierung, für sämtliche Variationen der Immun- und Affinitätsselektrophoresen und aller Elektrophoresen in restriktiven und nicht restriktiven Gelen und für die hochauflösende 2-D-Elektrophorese.

Hier können hohe Spannungen angelegt werden, weil es keine Probleme mit der Isolierung der Puffertanks gibt; viele Techniken benötigen im Horizontalsystem überhaupt keine Puffertanks mehr. Die meisten methodischen Anleitungen in Teil II beziehen sich auf diesen Typ Elektrophoresesystem, weil beinahe alle Methoden damit durchgeführt werden können. Die Multiphor-Kammer (siehe Abb. 1.13a) ist seit über 40 Jahren auf dem Markt ohne größere Modifikationen. Die Blue-Horizon-Kammer (siehe Abb. 1.13b) ist die neueste Entwicklung. Sie besitzt keine Puffertanks mehr, weil die Verwendung von Elektrodendochten mit konzentrierteren Elektrodenpuffern viel praktischer ist. Die Trenneinheit ist in Schubladenform in ein Gehäuse eingebaut. Dies hat mehrere Vorteile: Sie spart Platz auf dem Labortisch, weil der Elektrodendeckel in einer Parkvorrichtung verstaut werden und der Stromversorger oben auf das Gerät gestellt werden kann, und mehrere Geräte aufeinander gestapelt werden können. Auch die neuen Elektroden stellen eine Verbesserung dar: Weil sie aus platinisierten Titanstangen bestehen, sind sie viel robuster als die früher verwendeten Platindrähte. Außerdem wird das Gel im Gehäuse während des Laufes nicht dem Tageslicht ausgesetzt. Dies ist von Vorteil,



**Abb. 1.13** Verschiedene Horizontalelektrophoresekammern: (a) Trennkammer mit Kühlplatte und seitlichen Puffertanks. (b) Trennkammer in Gehäuse mit Schubladenkühlplatte ohne Puffertanks. (c) Gießkassette für dünne homogene und Gradientengele. (d) Anordnung eines Horizontalgels auf Trägerfolie mit in konzentrierten Puffern getränkten Elektrodendochten.

wenn man Proteine auftrennt, die mit lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen vormarkiert wurden. Abbildung 4.9c im Kapitel 4 zeigt eine Modifikation dieses Systems mit vier Kühlplatten für Mehrfachläufe. Bei beiden Kammern können die Elektrodenabstände für unterschiedliche Gelgrößen verändert werden.

Um gleichmäßige und effiziente Kühlung zu gewährleisten, wird zwischen Trägerglasplatte oder Trägerfolie und Kühlplatte eine dünne Schicht Kühlkontakteflüssigkeit aufgebracht. Diese Flüssigkeit darf keinen Strom leiten, muss isoosmotisch mit den Pufferkonzentraten und frei von Oberflächenspannung bzw. kompatibel mit der Massenspektrometrie sein. Früher wurde Kerosin verwendet. Als Ersatz verwendet man heute wässrige Lösungen, die Glycerin, Sorbit und das zwitterionische Detergens CHAPS enthalten. Sie ist leichter erhältlich und handhabbar und riecht nicht.

Wegen ihrer ausgezeichneten Sicherheitseigenschaften sind Horizontalkammern besonders gut für die Isoelektrische Fokussierung geeignet.

Im automatisierten Minielektrophoresesystem PhastSystem® war alles integriert: Horizontale Peltier-Kühl-/Thermostatisierplatte, programmierbarer Stromversorger und Färbemaschine. Das System ist mittlerweile vom Hersteller aus dem Programm genommen worden, die Verbrauchsmaterialien wie Fertiggele, Pufferstreifen und Färbereagenzien sind noch verfügbar (siehe hierzu auch Tab. 1.1).

Die verschiedenen Gelelektrophoresemethoden kann man in solche mit *restriktiven* und mit *nicht restriktiven* Medien einteilen. Restriktive Gelsysteme wirken der Diffusion entgegen: Die Zonen werden dadurch schärfer getrennt und hö-

**Tab. 1.1** Vergleich von horizontalen Flachbett- und vertikalen Gelsystemen.

Flachbettsysteme	Vertikale Systeme
Limitierte Geldicke, weil Kühlung nur von einer Seite erfolgen kann.	Höhere Proteinbeladungskapazität, weil dickere (bis zu 3 mm), von zwei Seiten gekühlte Gele verwendet werden können.
In Flachbettsystemen werden meist trägerfoliengestützte Gele verwendet. Die Trägerfolie kann aber für Blotting abgeschnitten werden.	Die Handhabung der dickeren Gele für Blotting ist einfacher.
Sehr vielseitig für unterschiedliche Methoden, ideal für die Isoelektrische Fokussierung.	Limitiert technische Möglichkeiten, nicht optimal für die Isoelektrische Fokussierung.
Direkte Kühlung ermöglicht eine exakte Temperaturkontrolle.	Keine oder nur indirekte Kühlung über den Puffer und die Glas-, Keramik- oder Plastikplatten.
Dünne Gelschichten können verwendet werden, die Probenaufgabe ist sehr einfach; dünne Gele haben höhere Nachweisempfindlichkeit und sind einfacher und schneller anzufärben.	Je dünner das Gel, umso komplizierter ist die Probenaufgabe und die Handhabung der Gele.
Meist werden trägerfoliengestützte Gele verwendet, die sehr leicht zu handhaben sind.	Gele ohne Trägerfolie sind nicht einfach zu handhaben. Aber man kann Gele auf mit Bind-Silan behandelte Glasplatten gießen.
Sehr vielseitig für unterschiedliche Gelgrößen: Gele können auseinander geschnitten werden, wenn nur wenige Proben aufzutrennen sind.	Es gibt Tanks für multiple Gele.
In Pufferkonzentrat getränktes Elektroden-dochte werden statt großer Puffervolumina verwendet.	Bei manchen Systemen werden große Puffervolumina benötigt (bis zu 25 L).
Geräte sind einfach zu bedienen und zu reinigen, keine Glasplatten notwendig, deshalb ideal für Routineanwendungen.	Viele Einzelteile zum Zusammensetzen und reinigen.
Hohe elektrische Sicherheit, Puffertanks können nicht miteinander in Kontakt kommen	Nur niedrige Spannungsmaximalwerte sind zulässig.
Fertiggele auf Trägerfolie sind umweltfreundlich.	Fertiggele in Einmalplastikkassetten verursachen viel Abfall.

her aufgelöst als bei nicht restriktiven Gelen, dadurch erhöht sich auch die Nachweisempfindlichkeit. Außerdem hat in restriktiven Gelen die Molekülgröße einen starken Einfluss auf das Trennergebnis.

## 1.2

### **Elektrophoresen in nicht restriktiven Gelen**

Bei diesen Techniken wird der Reibungswiderstand der Gelmatrix vernachlässigbar gering gehalten, sodass die elektrophoretische Mobilität nur von den Nettoladungen der Probenmoleküle abhängig ist. Bei hochmolekularen Proben wie Proteinen und Enzymen verwendet man horizontale Agarosegele, bei niedermolekularen wie Peptiden oder Polyphenolen horizontale Polyacrylamidgele.

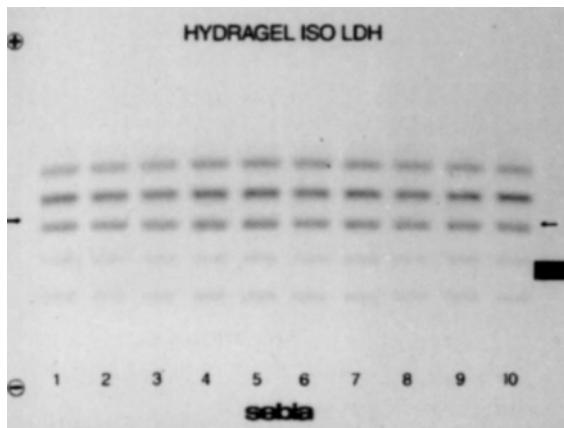
#### 1.2.1

##### **Agarosegelelektrophorese**

###### **1.2.1.1 Zonenelektrophorese**

Agarosegele mit Konzentrationen von 0,7–1 % werden sehr häufig in klinischen Routinelabors zur Analyse von Serumproteinen eingesetzt. Die Trennzeiten sind äußerst gering: ca. 30 min. Agarosegele werden auch für die Analytik von Isoenzymen mit diagnostischer Relevanz, wie z. B. Lactatdehydrogenase (Abb. 1.14) und Creatinkinase, eingesetzt.

Agarosegele sind wegen ihrer großen Poren besonders geeignet zum spezifischen Proteinnachweis durch *Immunfixation*: Im Anschluss an die Elektrophorese lässt man spezifische Antikörper in das Gel diffundieren. Die Immunkomplexe, welche mit den jeweiligen Antigenen gebildet werden, bilden unlösliche Präzipi-



**Abb. 1.14** Agarosegelelektrophorese von Lactatdehydrogenase-Isoenzymen. Spezifische Anfärbung mit Zymogrammtechnik.

tate, die nicht präzipitierten Proteine werden ausgewaschen. Bei der Anfärbung werden somit nur die spezifischen Fraktionen erfasst.

Ähnlich funktioniert das *Immunprinting*: Nach einer elektrophoretischen Trennung wird ein antikörperhaltiges Agarosegel oder eine mit Antikörpern getränkte Celluloseacetatfolie auf das Gel gelegt. Hier diffundieren die Antigene zu den Antikörpern. Die Identifizierung der Zonen erfolgt im antikörperhaltigen Medium. Immunprinting wird meistens bei engporigen Trenggelen angewendet. Immunblotting wird im Kapitel 7 erklärt.

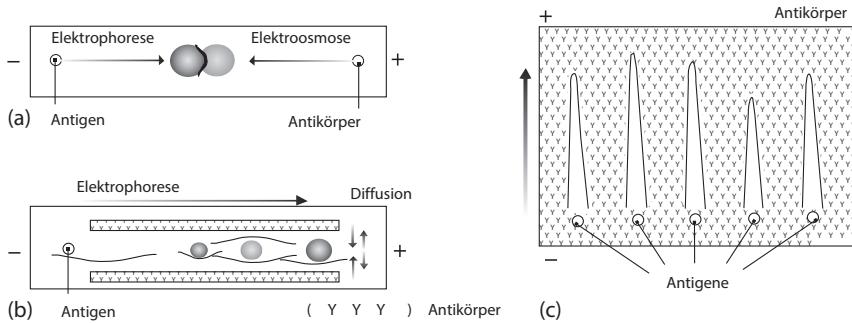
#### 1.2.1.2 Immunelektrophorese

Das Prinzip bei Immunelektrophoresen ist die Ausbildung von Präzipitationslinien am Äquivalenzpunkt zwischen Antigen und entsprechendem Antikörper. Wichtig bei diesen Methoden ist, dass das Mengenverhältnis zwischen Antigen und Antikörper richtig eingestellt ist (*Antikörpertiter*): Bei einem Antikörperüberschuss bindet sich – statistisch gesehen – maximal ein Antigen an einen Antikörper, bei einem Antigenüberschuss maximal ein Antikörper an ein Antigen. Bei einem bestimmten Antigen-Antikörper-Verhältnis (*Äquivalenzpunkt*) jedoch bilden sich riesige Makromoleküle

Antigen–Antikörper–Antigen–Antikörper– ...,

die in der Gelmatrix immobilisiert werden: *Immunpräzipitate*. Diese sind als weiße Linien im Gel sichtbar und können mit Proteinfarbstoffen angefärbt werden. Der Nachweis ist spezifisch, und die Empfindlichkeit ist sehr hoch, da sich scharfe Zonen ausbilden. Immunelektrophoresen lassen sich wiederum in drei methodische Prinzipien unterteilen (Abb. 1.15):

- Gegenstromelektrophorese* nach Bussard und Huer (1959): In einem Agarosegel mit hoher Elektroendosmose ist der Puffer auf einen pH-Wert von 8,6 eingestellt, damit die Antikörper keine Ladung tragen. Man lässt Probe und Antikörper, die in entsprechende Löcher eingesetzt wurden, gegeneinander laufen: Die geladenen Antigene wandern elektrophoretisch, die Antikörper werden durch den elektroosmotischen Fluss transportiert (Abb. 1.15a).
- Zonenelektrophorese/Immundiffusion* nach Grabar und Williams (1953): Erst wird eine Zonenelektrophorese der Proben in einem Agarosegel durchgeführt, nachfolgend eine Diffusion der Antigenfraktionen gegen die Antikörper, welche in seitlich neben den Trennspuren eingestanzte Rinnen eingesetzt werden (Abb. 1.15b).
- Rocket-Technik* nach Laurell (1966) und verwandte Methoden: Antigene wandern elektrophoretisch in ein Agarosegel, welches Antikörper in einer bestimmten Konzentration enthält. Wie bei a) sind die Antikörper durch geeignete Wahl des Puffers ungeladen. Bei der elektrophoretischen Wanderung der Probe werden von den Antikörpern im Gel so lange jeweils ein Antigen pro Antikörper gebunden, bis das Konzentrationsverhältnis dem Äquivalenzpunkt für den Immunkomplex entspricht. Dabei bilden sich raketenförmige



**Abb. 1.15** Die drei Prinzipien der Immunelektrophorese: (a) Gegenstromelektrophorese; (b) Zonenelektrophorese/Immundiffusion; (c) Rocket-Technik; für nähere Erläuterungen siehe Text.

Präzipitationslinien aus, die eingeschlossenen Flächen sind proportional zu den Konzentrationen der Antigene in den Proben (Abb. 1.15c). Hierzu gibt es eine Reihe von Modifikationen, auch zweidimensionale (siehe z. B. Abschn. 1.3.4.7, Kreuzimmunelektrophorese).

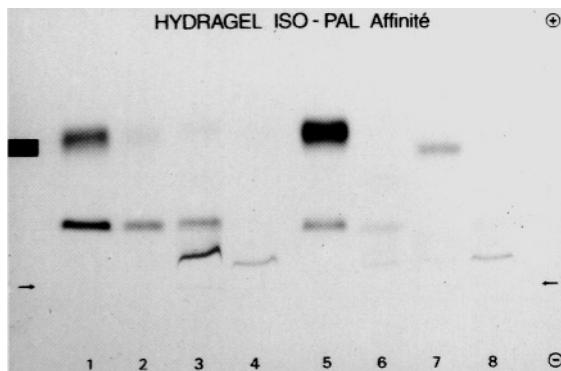
### 1.2.1.3 Affinitätselektrophorese

Hier handelt es sich um mit der Immunelektrophorese verwandte Methoden, die auf Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Makromolekülen z. B. für Lektin-Glykoprotein-, Enzym-Substrat- und Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen beruhen (Bøg-Hansen und Hau, 1981). Dabei werden alle aus der Immunelektrophorese bekannten Techniken angewandt. Zum Beispiel werden mit der Linienaffinitätselektrophorese spezifisch bindende Lektine aus weltweit gesammelten Pflanzensamen untersucht. Damit können Kohlenhydratveränderungen an Glykoproteinen während verschiedener biologischer Prozesse identifiziert werden. In Abb. 1.16 ist eine klinische Anwendung der Affinitätselektrophorese zur Unterscheidung der alkalischen Phosphatase aus Leber und Knochen gezeigt.

## 1.2.2

### Polyacrylamidgelelektrophorese von niedermolekularen Substanzen

Da sich niedermolekulare Fraktionen in einer großporigen Matrix chemisch nicht fixieren lassen, werden hierzu auf Folie polymerisierte ultradünne Polyacrylamidgele im Horizontalsystem verwendet, die sofort nach der Elektrophorese bei 100 °C getrocknet und anschließend mit spezifischen Reagenzien besprührt werden. Mit dieser Methode kann man z. B. Farbstoffe mit Molekülgrößen um 500 Da auftrennen (siehe Methode 1 in Teil II).



**Abb. 1.16** Affinitätselektrophorese von Iso-enzymen der alkalischen Phosphatase aus Leber und Knochen. Das Weizenkeimagglutinin bindet spezifisch die Knochenfraktion, die

als charakteristische Bande nahe der Auftragsstelle erkennbar ist. Zymogramm-Detektion für alkalische Phosphatase.

#### Hinweis

Nach den internationalen Empfehlungen der SI wird seit 1970 die Bezeichnung Dalton für  $1,6601 \times 10^{-27}$  kg nicht mehr empfohlen. Sie ist aber in der Biochemie eine gängige Größe.

### 1.3

#### Elektrophorese in restriktiven Gelen

##### 1.3.1

##### Der Ferguson-Plot

Obwohl bei der Elektrophorese im restriktiven Gel die elektrophoretischen Mobilitäten sowohl von der Anzahl der Nettoladungen als auch vom Molekularradius abhängen, kann die Methode auch zur physikochemischen Charakterisierung von Proteinen benutzt werden. Das Grundprinzip stammt von Ferguson (1964): Man trennt die Proben unter identischen Puffer-, Zeit- und Temperaturbedingungen, jedoch bei unterschiedlichen Gelkonzentrationen (g/100 mL bei Agarose, T (%) bei Polyacrylamid) auf. Dann ergeben sich in den verschiedenen Gelen unterschiedliche Laufstrecken:  $m_r$  bedeutet relative Mobilität. Trägt man den Logarithmus von  $m_r$  über der Gelkonzentration auf, so ergibt sich eine Gerade.

Die Steigung der Geraden (Abb. 1.17) ist ein Maß für die Molekülgröße und ist definiert als der *Retardationskoeffizient*, der  $K_R$ -Wert.

Bei globulären Proteinen gibt es eine lineare Beziehung zwischen  $K_R$  und dem Molekülradius  $r$  (Stokes-Radius): damit kann man die Molekülgröße aus der Steigung der Geraden berechnen. Wenn die freie Mobilität und der Molekülradius bekannt sind, kann man auch die Nettoladung berechnen (Hedrick und Smith,

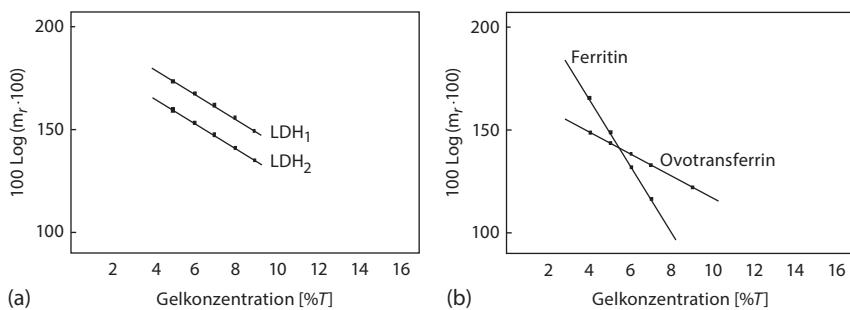


Abb. 1.17 Ferguson Plots: Auftragung der elektrophoretischen Wanderungsstrecken von Proteinen über Gel-Konzentrationen. (a) Lactatdehydrogenase-Isoenzyme; (b) verschiedenartige Proteine. Nähere Erläuterung im Text.

1968). Bei Proteingemischen lassen sich aufgrund der Lage der Proteingeraden folgende Aussagen machen:

- Parallele Geraden weisen auf identische Größe, aber Ladungsheterogenität hin, z. B. auf Isoenzyme (Abb. 1.17a).
- Wenn zwei Geraden unterschiedliche Steigungen haben, sich aber nicht schneiden, ist das Protein der oberen Gerade das kleinere und hat eine höhere Nettoladung als das andere.
- Kreuzen sich die Geraden im Bereich über  $T = 2\%$ , ist das größere der beiden Proteine stärker geladen und schneidet die  $y$ -Achse weiter oben (Abb. 1.17b).
- Schneiden sich mehrere Geraden in einem Punkt, der sich im Bereich  $T < 2\%$  befindet, handelt es sich offensichtlich um verschiedene Polymere eines Proteins (gleiche Nettoladung, unterschiedliche Molekülgrößen).

### 1.3.2

#### Agarosegelelektrophorese

##### 1.3.2.1 Proteine

Da hochkonzentrierte Agarosegele über 1% ( $> 1\text{ g}/100\text{ mL}$  Agarose in Wasser) trüb sind und die Elektroendosmose hoch ist, werden Agarosegele nur bei der Trennung von sehr hochmolekularen Proteinen oder Proteinaggregaten verwendet. Weil Agarosegele keine Katalysatoren enthalten, welche das Puffersystem beeinflussen, sind sie auch zur Entwicklung einer Reihe von mehrfach diskontinuierlichen Puffersystemen eingesetzt worden (Jovin *et al.*, 1970).

##### 1.3.2.2 Nukleinsäuren

Agarosegelelektrophorese ist die Standardmethode für die Trennung, Identifizierung, RFLP-Analyse und Reinigung von DNA- und RNA-Fragmenten (Green und Sambrook, 2012; Rickwood und Hames, 1982). Für diese Nukleinsäuretrennungen werden horizontale Submarine-Gele verwendet: Das Agarosegel liegt dabei

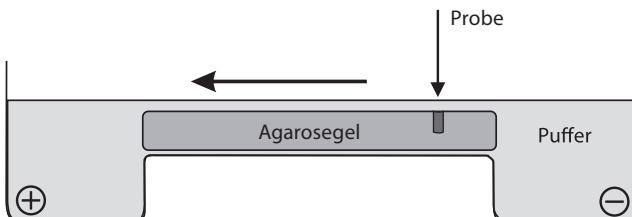


Abb. 1.18 „Submarine“-Technik für Nukleinsäuretrennungen.

direkt im Puffer (Abb. 1.11 und 1.18). Die Gele werden mit Ethidiumbromid, SYBR Green oder DNA Stain gefärbt. Die Banden werden unter UV-Licht visualisiert.

Wenn ein Gel mit besonders hohen Siebeigenschaften benötigt wird, kann man die Agarose teilweise durch Polysaccharide substituieren (Perlman *et al.*, 1987).

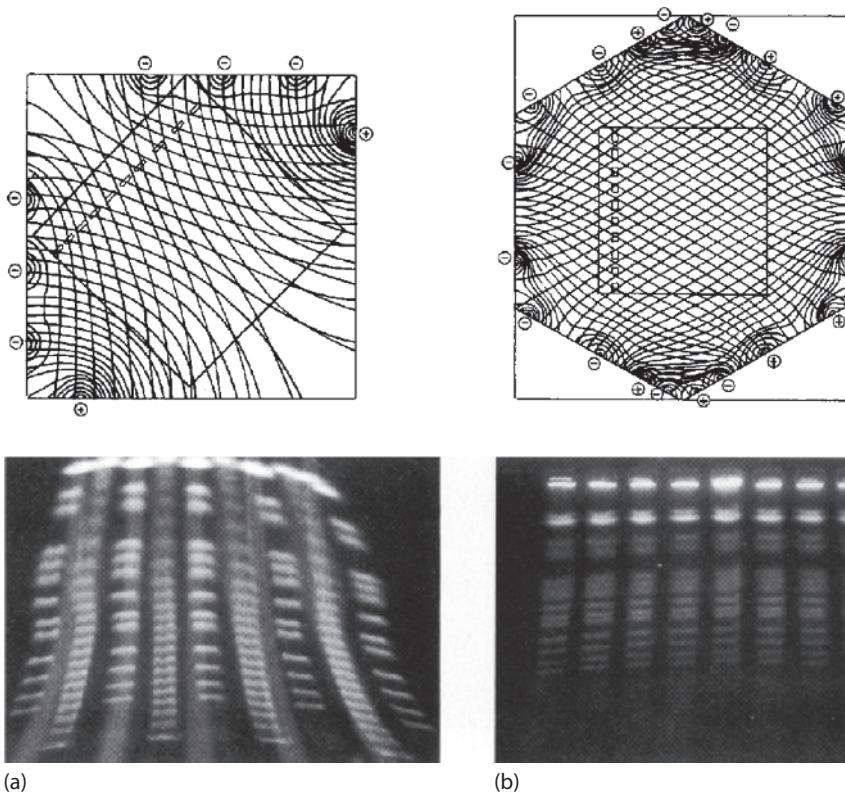
#### Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFG)

Für die Chromosomentrennung setzt man die *Gelelektrophorese im gepulsten Feld* (PFG) nach Schwartz und Cantor (1984) ein; dies ist eine modifizierte Submarine-Technik. Hochmolekulare DNA-Moleküle über 20 kb (Kilobasen) richten sich bei konventioneller Elektrophorese der Länge nach aus und wandern mit gleichen Mobilitäten, sodass keine Auf trennung stattfindet.

Bei der PFG müssen die Moleküle wegen der geografischen Änderung des elektrischen Feldes ihre Orientierung ändern, ihre Helixstruktur wird dabei zuerst gestreckt, bei Änderung des Feldes gestaucht. Die *viskoelastische Relaxationszeit* ist abhängig vom Molekulargewicht. Außerdem brauchen größere Moleküle zur *Umorientierung* eine längere Zeit als kleinere. Dies bedeutet, dass nach der erneuten Streckung und abgeschlossener Umorientierung für größere Moleküle – in der gegebenen Pulsdauer – weniger Zeit für die eigentliche elektrophoretische Wanderung übrigbleibt. Auf diese Weise ist die resultierende elektrophoretische Mobilität abhängig von der Pulsationszeit bzw. von der jeweiligen Dauer des elektrischen Feldes: man erhält eine Auf trennung nach Molekülgroße bis in die Größenordnung von 10 Mb. Auch für kürzere DNA-Fragmente ist das Auflösungsvermögen bei PFG besser als bei konventionellen Submarine-Elektrophoresen.

Für die Analyse von Chromosomen erfolgt die Probenvorbereitung inklusive Zellaufschluss in Agaroseblöckchen, die dann in vorgeformte Geltaschen eingesetzt werden. Diese großen Moleküle würden beim Pipettieren durch die Scherkräfte brechen. Für die Trennung verwendet man 1,0–1,5 %ige Agarosegele.

Die elektrischen Felder sollen, von der Probe aus gesehen, einen Mindestwinkel von 110° zueinander haben. Dies erreicht man z. B. durch inhomogene Felder mit Punktelektroden auf rechteckigen Schienen oder in hexagonaler Anordnung (siehe Abb. 1.19a,b). Die Pulsdauer reicht bei diesen Techniken von 1 s bis 90 min, abhängig von den Längen der zu trennenden DNA-Moleküle. Bei längeren Pulszeiten werden größere Moleküle besser aufgelöst, bei kürzeren Pulszeiten die kleineren. Die Trennungen können bis zu mehreren Tagen dauern.



**Abb. 1.19** Feldlinien und Trennergebnis bei zwei verschiedenen Elektrodenanordnungen der PFG: (a) Zweifach inhomogene Felder bei rechtwinklig und (b) homogene Felder bei hexagonal angeordneten Punktelektroden.

Abbildung 1.19a,b zeigt die Feldlinien bei rechtwinkliger Elektrodenschienenanordnung mit inhomogenen Feldern und bei hexagonaler Anordnung mit homogenen Feldern sowie die entsprechenden Beispiele von Trennergebnissen.

Zusätzlich gibt es noch weitere Feldgeometrien:

Die *Field-Inversion (FI)-Elektrophorese*: Das elektrische Feld wird in einer Richtung in bestimmten Pulsfrequenzen hin und her geschaltet.

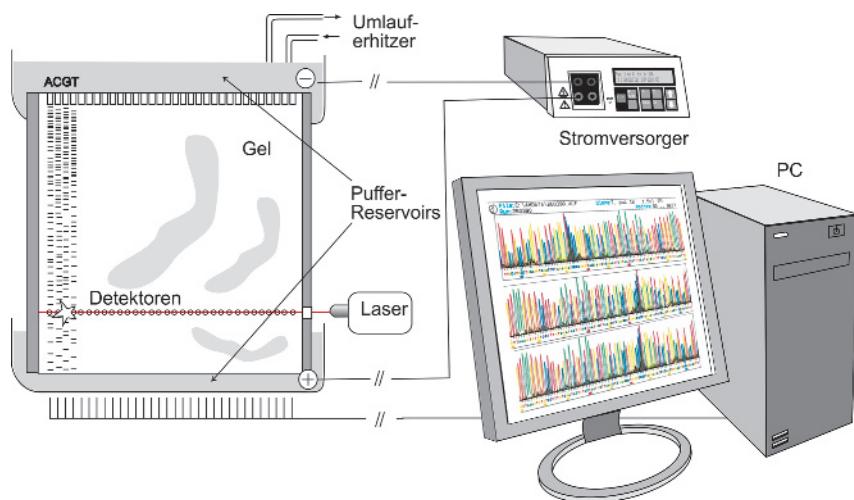
Die *Transverse-Alternating-Field-Elektrophorese (TAFE)*: Das Gel befindet sich aufrecht stehend in der Mitte eines Aquarium ähnlichen Puffertanks, das Feld wird zwischen zwei links und rechts oberhalb und unterhalb des Gels befindlichen, diagonal gegenüberstehenden Elektrodenpaaren hin und her geschaltet.

### 1.3.3

#### Polyacrylamidgelektrophorese von Nukleinsäuren

##### 1.3.3.1 DNA-Sequenzierung

Bei den DNA-Sequenzierungsmethoden nach Sanger und Coulson (1975) oder Maxam und Gilbert (1977) ist der letzte Schritt jeweils eine Vertikalelektrophorese.



**Abb. 1.20** Apparative Anordnung der automatisierten DNA-Sequenzierung. Auf dem Computerbildschirm: typisches Trennergebnis nach Aufbereitung der Rohdaten im Computer.

rese im Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen. Die vier Reaktionen – sie enthalten die jeweils mit einer bestimmten Base endenden, verschiedenen langen Stücke eines zu sequenzierenden DNA-Stückes – werden nebeneinander aufgetrennt. Die Ablesung der Reihenfolge der Banden in diesen vier Spuren vom unteren zum oberen Ende des Gels ergibt die Basensequenz, die genetische Information.

Zur vollständigen Denaturierung der Moleküle wird zumeist bei hoher Temperatur über 50 °C und in Gegenwart von Harnstoff gearbeitet. Die ungleiche Wärmeverteilung bei der Elektrophorese resultiert im Smiling-Effekt, das sind zu den Rändern hin verzogene Bandenmuster. Es hat sich deshalb bewährt, das Gel unabhängig vom elektrischen Feld mit Thermostatisierplatten, die an einen externen Thermostaten angeschlossen sind, zu erwärmen.

Bei der *automatischen* Sequenzierung verwendet man fluoreszenzmarkierte Proben. Ein fixierter Laserstrahl durchdringt ständig das Trenngel in ganzer Breite im unteren Fünftel der Trennstrecke. Auf dieser Höhe befindet sich hinter der Glasplatte an jeder Trennspur eine Fotozelle. Wenn eine Bande während ihrer Wanderung an dieser Stelle ankommt, werden die fluoreszierenden DNA-Fragmente durch das Laserlicht angeregt und emittieren Lichtsignale. Da jeder Trennspur eine eigene Fotozelle zugeordnet ist, werden die wandernden Banden jeder Trennspur nach ihrer Reihenfolge – und damit die Sequenzen – im Computer registriert (Abb. 1.20). Die hohe Nachweisempfindlichkeit der Fluoreszenzmarkierung ermöglicht auch die Sequenzierung von Cosmiden, Lambda-DNA und Produkten aus der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Außerdem können Restriktionsanalysen durchgeführt werden.

Solche *Online*-Gelelektrophoresesysteme werden heutzutage hauptsächlich zur DNA-Typisierung verwendet, weil sie bereits vor längerer Zeit durch Hoch-

durchsatz-Multikapillarelektrophorese-Instrumente ersetzt worden sind. Mittlerweile ist auch diese Technik, durch mehrere neue – nicht elektrophoretische – Methoden des *Next Generation DNA Sequencing* abgelöst worden. Diese Technologien verwenden parallelisierte Sequenzierprozesse, welche Tausende oder Millionen Sequenzen auf einmal analysieren.

### 1.3.3.2 DNA-Fragment-Analysen von PCR-Produkten

#### PAGE und Silberfärbung

Für PCR-Produkte, deren Größenbereich zwischen 50 und 1500 bp (Basenpaare) liegt, kommt die Agarosegelektrophorese an die Grenzen des Auflösungsvermögens und der Empfindlichkeit der Ethidiumbromidfärbung. Mit Polyacrylamidgelen erhält man deutlich schärfere Banden und höhere Auflösung, mit der Silberfärbung eine Empfindlichkeit bis zu 15 pg (Pikogramm) pro Bande (Bassam *et al.*, 1991). Aber Vorsicht! Während in der Agarosegelektrophorese die Mobilitäten der DNA-Fragmente ausschließlich proportional zu ihren Größen sind, werden die Bandenpositionen in nativen Polyacrylamidgelen teilweise auch noch von der Basensequenz beeinflusst: A- und T-reiche Fragmente wandern langsamer als C- und G-reiche. Ein Beispiel: Der „Spike“ – die verstärkte Bande – eines 100 bp DNA-Marker-Gemisches erscheint in Agarosegelen an der Position von 800 bp, in nativen Polyacrylamidgelen an der Position von 1200 bp. Nur unter vollständig denaturierenden Bedingungen sind die Laufgeschwindigkeiten der DNA-Moleküle auch im Polyacrylamidgel proportional zu den Größen, sonst würde die DNA-Sequenzierung in Polyacrylamidgelen nicht funktionieren.

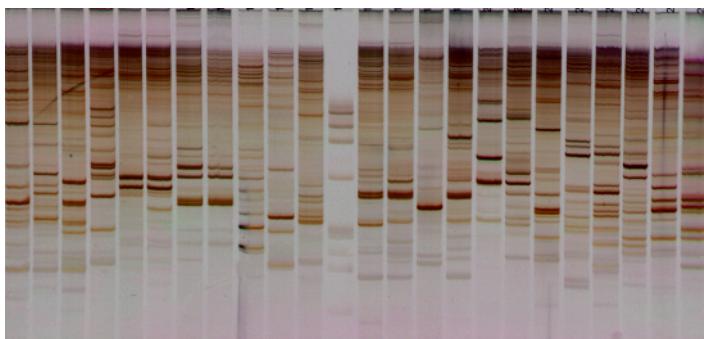
Silbergefärbte DNA-Banden können direkt – ohne Aufreinigung – reamplifiziert werden, nachdem sie aus dem Gel herausgekratzt wurden. Circa 20 % der DNA-Moleküle einer Bande bleiben von der Silberfärbung unzerstört. Wie bereits erwähnt, wird DNA-Typisierungen mittlerweile hauptsächlich in Kapillaren durchgeführt, die Reamplifizierung von DNA-Fragmenten funktioniert aber nur nach der Gelektrophorese.

DNA-Fragment Analysen von PCR-Produkten werden für unterschiedliche Zwecke eingesetzt, z. B. für die:

- molekularbiologische Forschung,
- Identifizierung von Bakterien-, Pilzen-, Pflanzen- und Tierspezies, z. B. mit RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); siehe unten und Abb. 1.21,
- Detektion von Mutationen, z. B. mit SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)-Analysen (siehe unten),
- genetische Untersuchungen wie Vaterschaftsbestimmungen und Identifizierung von Tätern in der forensischen Medizin durch die Analyse von Mini- und Mikrosatelliten.

#### RAPD-Methode

Ein kurzer (10-mer) Oligonukleotid-Primer mit zufälliger DNA-Sequenz wird zur Amplifizierung von Fragmenten aus der genomischen DNA eines Organismus



**Abb. 1.21** RAPD-Elektrophorese von Pilzsorten in einem horizontalen Polyacrylamidgel. Silberfärbung. Mit freundlicher Genehmigung von Birgit Jäger und Dr. Hans-Volker Tichy, TÜV Südwest GmbH – Abteilung für biologische Sicherheit, Freiburg im Breisgau.

verwendet (Welsh und McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Dabei vervielfältigen sich DNA-Sequenzbereiche, die von der Primer-Sequenz eingeschlossen werden. Es entstehen je nach Organismus mehrere Sätze von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe, die in der Elektrophorese individuelle Muster erzeugen (Abb. 1.21).

#### SSCP-Methode

Abweichungen in der DNA-Sequenz, die so gering wie der Austausch einer einzigen Base sein können, verändern die Sekundärstrukturen von DNA-Einzelsträngen (ssDNA) so, dass sich unter bestimmten Trennbedingungen unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten im Polyacrylamidgel ergeben. Diese Laufverschiebungen können im Gel detektiert werden. Weitere Erläuterungen sind zu finden bei der Methode 14 im Teil II.

#### 1.3.4

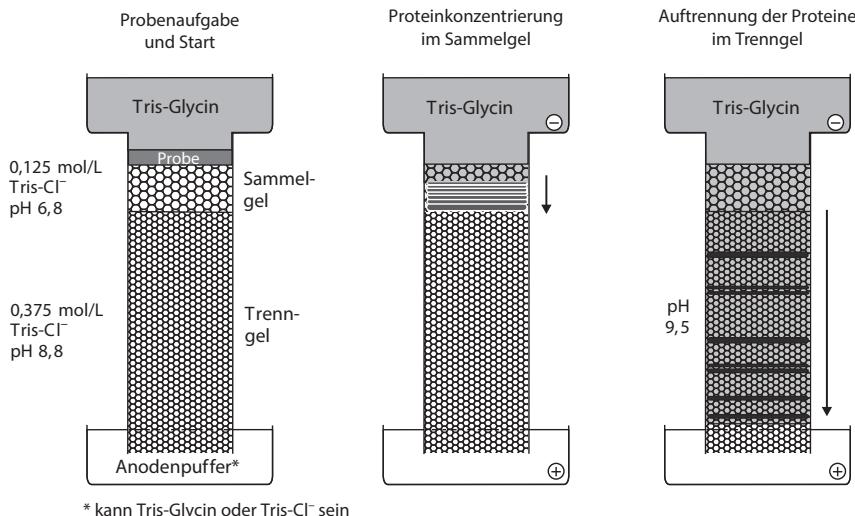
#### Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

##### 1.3.4.1 Disk-Elektrophorese

Die diskontinuierliche Elektrophorese nach Ornstein (1964) und Davis (1964) löst bei der Auftrennung von Proteinen in engporigen Gelen zwei Probleme auf einmal: Sie verhindert das Aggregieren und Präzipitieren von Proteinen beim Eintritt in die Gelmatrix und bewirkt eine hohe Bandenschärfe. Die Diskontinuität bezieht sich auf vier Parameter (siehe hierzu auch Kapitel 2, Isotachophorese):

- Gelstruktur,
- pH-Wert der Puffer,
- Ionenstärke der Puffer,
- Art der Ionen im Gel- und im Elektrodenpuffer.

Abbildung 1.22 zeigt die drei wichtigen Schritte bei der Disk-Elektrophorese. Die Gelmatrix ist in zwei Bereiche eingeteilt: das Trengel und das Sammelgel.



**Abb. 1.22** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Disk-Elektrophorese nach Ornstein (1964). Dieses Puffersystem wird auch für die klassische diskontinuierliche SDS-Elektrophorese verwendet.

Das engporige Trenngel (z. B. mit 12 %  $T$ ) enthält 0,375 mol/L Tris-HCl-Puffer pH 8,8, das großporige Sammelgel (mit 4 %  $T$ ) 0,125 mol/L Tris-HCl-Puffer pH 6,8. Neben dem gemeinsamen Kation Tris enthält der Elektrodenpuffer ausschließlich Glycin, die beiden Gelpuffer ausschließlich Cl<sup>-</sup> als Anionen. Glycin hat einen pH von 6,7; deshalb hat es bei pH 6,8 im Sammelgel fast keine Nettoladung. Damit hat das Glycin eine sehr niedrige Mobilität. Glycin ist sehr hydrophil und bindet nicht an Proteine.

Wenn das elektrische Feld angelegt wird, trennen sich die Proteine nach dem Prinzip der *Isotachophorese* auf und bilden einen Stapel in der Reihenfolge der Mobilitäten (Stacking-Effekt). Dabei konzentrieren sich die einzelnen Zonen. Wegen der großporigen Gelmatrix sind die Mobilitäten nur von den Ladungen abhängig, nicht von den Molekülgrößen. Dabei ergibt sich ein zweiter wertvoller Effekt: Wegen der relativ niedrigen Wanderungsgeschwindigkeit wandern die Proteine langsam in die großporige Gelmatrix ein ohne sich schlagartig aufzukonzentrieren.

Der Proteinstapel bewegt sich – relativ langsam mit konstanter Geschwindigkeit – in Richtung Anode, bis er an die Grenzschicht des engporigen Trenngels gelangt. Die Proteine erfahren plötzlich einen hohen Reibungswiderstand, sodass ein Stau entsteht, der zur weiteren Zonenschärfung führt. Das niedermolekulare Glycin wird davon nicht betroffen und überholt die Proteine, wird bei dem pH-Wert von 8,8 stark geladen, die neue Cl<sup>-</sup>/Glycin<sup>-</sup>-Front wandert ein Stück vor den Proteinen.

Jetzt geschehen mehrere Dinge gleichzeitig:

- Die Proteine befinden sich in einem homogenen Puffermilieu und beginnen sich nach dem zonenelektrophoretischen Prinzip aufzutrennen. Die Pufferdiskontinuität gibt es jetzt nur noch an der Front.
- Ihre Mobilität ist nun sowohl von den Ladungen als auch der Molekülgröße abhängig. Dabei arrangiert sich die Folge der Proteinionen neu.
- Wegen des  $pK$ -Wertes der Aminogruppe des Glycins steigt der pH-Wert auf pH 9,5, dadurch erhalten die Proteine höhere Nettoladungen und die Trennung wird schneller.

Mit der Disk-Elektrophorese werden sehr hohe Auflösung und Bandenschärfe erzielt. Allerdings werden beim oben beschriebenen Beispiel Proteine mit  $pI > 6,8$  in Richtung Kathode transportiert und gehen verloren. Zur Trennung dieser Proteine muss ein anderes Puffersystem, z. B. mit saurem pH-Wert, verwendet werden. Eine Auswahl ist im Buch von Maurer (1968) und bei Jovin *et al.* (1970) zu finden. Man kann auch alle Proteine mit SDS beladen damit sie alle negativ geladen sind (siehe unten: SDS-Elektrophorese).

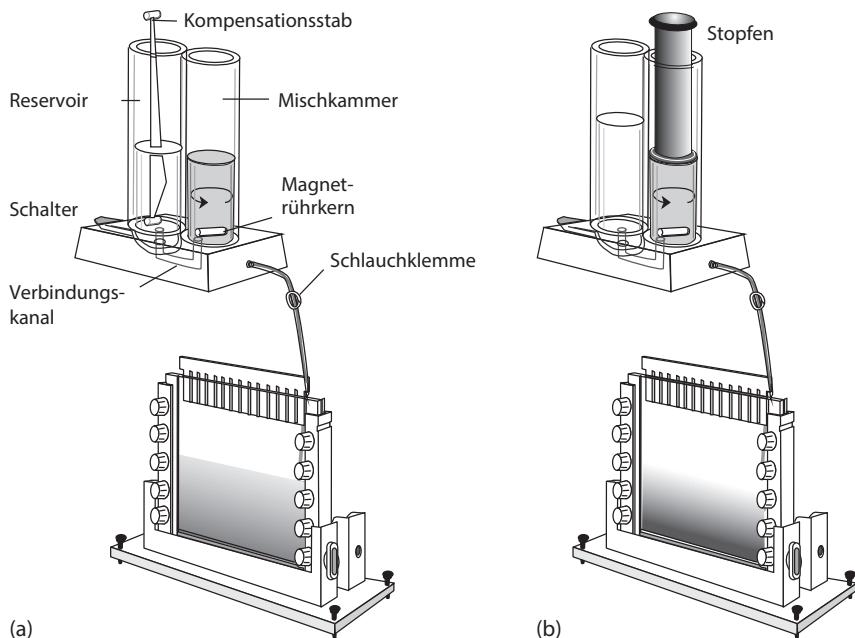
Sammel- und Trengel werden erst unmittelbar vor der Elektrophorese aufeinander gegossen, weil bei längerem Stehenlassen des Gesamtgels die Ionen ineinander diffundieren.

#### 1.3.4.2 Gradientengelektrophorese

Durch kontinuierliche Veränderung der Acrylamidkonzentration in der Polymerisationslösung erhält man Porengradientengele, welche zur Ermittlung der Moleküldurchmesser von Proteinen im Nativzustand eingesetzt werden (Rothe und Purkhanbaba, 1982).

Wenn im engporigen Bereich die Acrylamidkonzentration und der Vernetzungsgrad hoch genug gewählt sind, gelangen die Proteinmoleküle mit der Zeit an einen Punkt, wo sie aufgrund ihrer Größe im stets engmaschiger werdenden Gelnetzwerk stecken bleiben. Weil die Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Proteinmoleküle auch von deren Ladungen abhängen, muss die Elektrophorese so lange dauern, bis auch das Molekül mit der niedrigsten Nettoladung an seinem Endpunkt angekommen ist. Die Bestimmung der Molekulargewichte auf diese Art ist problematisch, weil die Tertiärstrukturen verschiedener Proteine unterschiedlich sind: Strukturproteine können nicht mit globulären Proteinen verglichen werden.

Es gibt eine Reihe von Methoden, Gele mit linearen oder exponentiellen Porengradienten herzustellen. Alle haben ein gemeinsames Prinzip: Es werden zwei Polymerisationslösungen mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen hergestellt. Während des Gießens wird der hochkonzentrierten Lösung kontinuierlich niederkonzentrierte Lösung zugemischt, sodass die Konzentration in der Gießküvette von unten nach oben abnimmt (Abb. 1.23). Beim Gießen einzelner Gradienten lässt man die Lösung von oben in die Küvette laufen. Wenn man mehrere Gele gleichzeitig herstellen will, drückt man die Lösung von unten in den



**Abb. 1.23** Gießen von Gradientengelen mit einem Gradientenmixer. Der Magnetkern wird von einem Magnetrührmotor angetrieben (nicht gezeigt). (a) Linearer Gradient; (b) exponentieller Gradient.

Mehrfachgießstand. Dann werden die Lösungen in Mischkammer und Reservoir vertauscht (siehe Methode 8 im Teil II).

Damit sich die Schichten in der Küvette nicht untereinander mischen, wird die hochkonzentrierte Lösung zusätzlich mit Glycerin oder Saccharose beschwert. Man gießt im Prinzip einen Dichtegradienten. Die Vermischung der nachfließenden leichten Lösung mit der schweren Lösung erfolgt in der Mischkammer mittels des Magnetkernes.

Lässt man die Mischkammer nach oben offen (Abb. 1.23a), gilt das Prinzip der kommunizierenden Röhren: Damit beide Flüssigkeitsniveaus immer gleich hoch sind, fließt halb so viel leichte Lösung nach wie Lösung aus der Mischkammer ausfließt. Dabei ergibt sich ein linearer Gradient. Ein *Kompensationsstab* im Reservoir gleicht das Volumen des Magnetkernes und den Dichteunterschied zwischen den beiden Lösungen aus.

Exponentielle Gradienten entstehen, wenn man die Mischkammer mit einem Stempel verschließt (Abb. 1.23b). Das Volumen in der Mischkammer bleibt konstant, es fließt so viel leichte Lösung nach wie Lösung aus der Mischkammer ausfließt.

Um Störungen im Gel durch thermische Konvektion zu verhindern, sollte die leichte Monomerlösung ca. 20 % mehr Ammoniumpersulfat enthalten als die schwere Lösung: Dann startet die Polymerisation von oben her. Eine alternative

Gießmethode – das Gießen eines einzelnen Gradientengels von unten – ist in Methode 9 für die Blau-Nativ-Elektrophorese gezeigt.

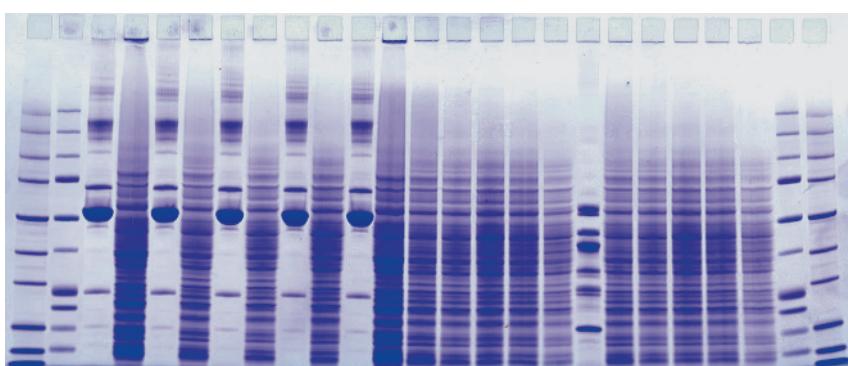
#### 1.3.4.3 SDS-Elektrophorese

Die von Shapiro *et al.* (1967) eingeführte SDS-Elektrophorese – SDS ist die englische Abkürzung von Natriumdodecylsulfat – trennt ausschließlich nach unterschiedlichen Molekülgrößen auf. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergens SDS werden die Eigenladungen von Proteinen so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen: mit ca. 1,4 g SDS pro Gramm Protein. Zudem werden die unterschiedlichen Molekülformen ausgeglichen, indem die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst werden.

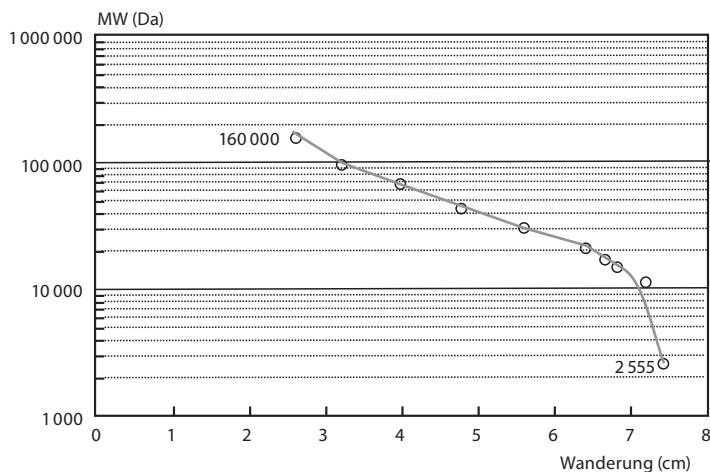
Schweifelbrücken – zwischen Cysteinen – werden nur durch Zugabe eines reduzierenden Thiolreagens, z. B.  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT, aufgespalten. Häufig schützt man die SH-Gruppen noch durch eine darauffolgende Alkylierung mit Iodacetamid, Iodessigsäure oder Vinylpyridin (Lane, 1978).

Bei der Elektrophorese im restriktiven Polyacrylamidgel, das 0,1 % SDS enthält, ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungsstrecken dieser SDS-Polypeptid-Mizellen. Diese lineare Beziehung gilt nur in einem gewissen Bereich, der vom Größenverhältnis Molekülmasse zum Porendurchmesser bestimmt ist. Abbildung 1.24 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel, das nach der Trennung mit Coomassie Blau R-250 angefärbt worden ist.

Porengradientengele haben einen weiteren Trennbereich und einen weiteren linearen Trennbereich als Gele mit konstanten Porendurchmessern. Außerdem erzielt man damit sehr scharfe Banden, weil das Gradientengel der Diffusion entgegenwirkt. Ein paar Beispiele von Ergebnissen in SDS-Porengradientengelen sieht man in Abb. 6.4. Mithilfe von Markerproteinen lassen sich über eine Eichkurve



**Abb. 1.24** Proteintrennung in einem horizontalen SDS-Polyacrylamidgel  $T = 12,5\%$  (Kathode oben). Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R-250. Proben: Humanserum, Leguminosen Samenextrakte, verschiedene Markerproteingemische.



**Abb. 1.25** Molekulargewichtskurve in der halblogarithmischen Darstellung: Die Molekulargewichte von Eichproteinen sind über ihren Wanderungsstrecken aufgetragen.

die Molekulargewichte der Proteine ermitteln (Abb. 1.25). Markerproteingemische gibt es für unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche. Vorgefärbte Größenmarker mit unterschiedlichen Farben sind sehr hilfreich zur Beobachtung der Trennung und der Abschätzung der Molekülgrößen während des Laufes. Auch fluoreszenzmarkierte Markerproteingemische sind erhältlich.

Bei Auftrennungen von physiologischen Flüssigkeiten, z. B. bei der Urinproteinanalyse, verzichtet man auf die Reduzierung, um zu verhindern, dass sich Immunglobuline in Untereinheiten zerlegen. Man nimmt dabei die unvollständige Auffaltung bestimmter Proteine in Kauf und erhält damit keine exakte Molekulargewichtsbestimmung.

Das Wanderungsverhalten von Albumin ist ein gutes Beispiel: Wenn es nicht reduziert ist, täuscht es ein Molekulargewicht von 68 kDa anstelle von 68 kDa vor, da die Polypeptidkette nicht vollständig gestreckt ist.

Mehrere Arbeitsgruppen, Ibel *et al.* (1990), Samso *et al.* (1995) und Westerhuis *et al.* (2000) haben die Strukturen der SDS-Proteinkomplexe als „Halskettenformen“ beschrieben. Das heißt, dass nicht alle Teile der Polypeptidketten mit SDS-Molekülen abgedeckt sind, und dass die Molekülgrößen, die man aus der Interpolation mit Markerproteinen ermittelt hat, nicht immer mit den Molekulargewichten, die mit der Massenspektrometrie bestimmt worden sind, korrelieren. In Abschn. 5.3 (Probenvorbereitung für die SDS-Elektrophorese) ist versucht worden, solche Strukturen in Zeichnungen darzustellen.

Die SDS-Elektrophorese hat eine Reihe praktischer Vorteile:

- Mit SDS gehen und bleiben beinahe alle Proteine in Lösung, auch sehr hydrophobe und denaturierte Proteine.
- Weil SDS-Proteinkomplexe stark geladen sind, haben sie eine hohe elektrophoretische Mobilität. Dadurch ergeben sich schnelle Trennungen.

- Alle Fraktionen laufen, wegen einheitlicher negativer Ladung der SDS-Protein-Mizellen, in *eine* Richtung, zur Anode.
- Durch die SDS-Behandlung werden die Polypeptidfäden entfaltet und gestreckt, die Trennung wird in stark restriktiven Gelen durchgeführt; dies schränkt die Diffusion ein.
- Dadurch erhält man hohes Auflösungsvermögen und scharfe Zonen.
- Die Fixierung der Banden ist einfach, es sind keine starken Säuren notwendig.
- Die Trennung erfolgt nach *einem* einzigen physikochemischen Parameter, der Molekülgröße. Damit hat man eine einfache Methode zur Abschätzung von Molekulargewichten.
- Ladungsmikroheterogenitäten von Isoenzymen werden ausgeschaltet. Man erhält *eine* Bande für *ein* Enzym.
- Mit SDS-Elektrophorese getrennte Proteine binden mehr Farbstoff, dadurch ergibt sich etwa zehnmal so hohe Nachweisempfindlichkeit wie bei Nativ-elektrophoresen.
- Nach elektrophoretischem Transfer auf eine immobilisierende Membran kann das SDS wieder von den Proteinen entfernt werden, ohne die Proteine selbst dabei zu eluieren (siehe Kapitel 7, Blotting).

SDS-Elektrophoresen können im kontinuierlichen Phosphatpuffersystem nach Weber und Osborn (1969) oder in diskontinuierlichen Systemen durchgeführt werden.

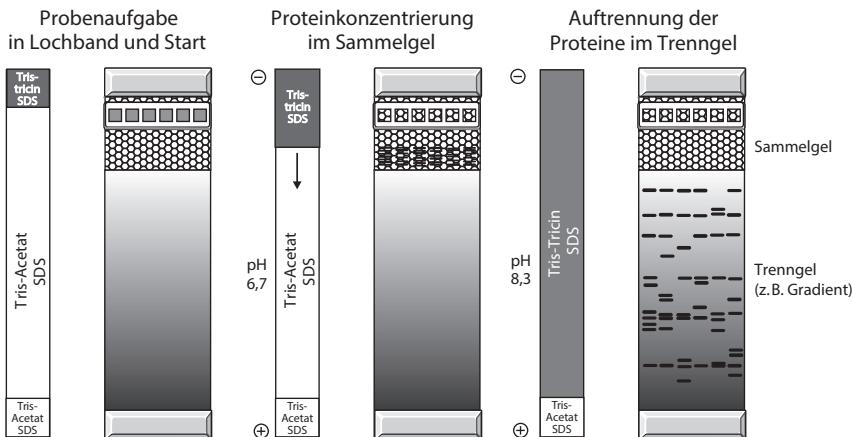
Lämmli (1970) hat die Disk-Elektrophorese-Methode nach Ornstein und Davis direkt für SDS-beladene Proteine übernommen, obwohl man den pH-Wert- und Ionenstärkensprung dabei nicht benötigt:

- Weil die Protein-SDS-Mizellen hohe negative Nettoladungen tragen, ist die Mobilität des sehr hydrophilen – und damit nicht mit SDS beladenen Glycins – in einem großporigen Sammelgel zu Beginn der Elektrophorese selbst bei pH 8,8 niedriger als die der Proteine. Wichtig ist allerdings die Diskontinuität der Anionen und die unterschiedliche Gelporosität.
- Während des Stacking entsteht kein Feldstärkegradient, weil es keine Ladungsunterschiede innerhalb der Probe gibt: daher benötigt man hier keine niedrige Ionenstärke.

Aus dieser Tatsache folgt auch, dass man ein SDS-Disk-Elektrophoresegel in einem Arbeitsgang herstellen kann:

Man gibt zum Trengel etwas Glycerin zu und überschichtet es direkt mit der Sammelgellösung, die kein Glycerin enthält. Man sollte aber die Sammelgelmonomerlösung mit einem Puffer pH 6,8 herstellen, weil das niederkonzentrierte Gel bei pH 8,8 nicht gut polymerisiert. Man kann sich damit das Überschichten des Trengels mit Butanol o. Ä. sparen und vor allem das mühsame Entfernen der Flüssigkeit vor dem Gießen des Sammelmols.

Da es bei solchen Gelen keine Probleme mit der Diffusion von Sammel- und Trengelpuffer geben kann, sind sie länger lagerfähig als klassische Disk-Gele. Allerdings ist die Lagerfähigkeit durch den hohen pH-Wert des Puffers im Gel



**Abb. 1.26** Prinzip eines diskontinuierlichen Puffersystems im Fertiggel: Horizontales Gel mit Tris-Tricin-Pufferstreifen.

limitiert, weil nach ca. zehn Tagen die Polyacrylamidmatrix zu hydrolyseren beginnt. Für Fertiggele mit hoher Lagerstabilität muss man alternative Puffer mit pH-Werten unter 7 verwenden.

#### Lagerfähige Gele

Durch empirische Versuche hat sich ein Tris-Acetat-Puffer mit pH 6,7 im Gel als optimal für Lagerstabilität und Trennung erwiesen. Dann benötigt man Tricin anstelle von Glycin als Folgeion. Abbildung 1.26 zeigt die Funktionsweise dieses Puffersystems mit Elektrodenpufferstreifen in einem SDS-Fertiggel. Da Tricin erheblich teurer als Glycin ist, verwendet man es nur im Kathodenpuffer; der Anodenpuffer enthält Tris-Acetat.

Alternative Ansätze verwenden entweder einen BisTris-Gelpuffer pH 7,0 oder eine Kombination von 76 mmol/L Tris-HCl und 100 mmol/L von drei Aminosäuren: Serin, Glycin und Asparaginsäure (Ahn *et al.*, 2001). Seit kurzem gibt es lagerstabile Minigele für native und SDS-Elektrophoresen mit einem Tris-Glycin-Cl<sup>-</sup>-Puffer mit einem pH Wert unter 7. Ein paar Ergebnisse sieht man in Abb. 6.4.

#### SDS-Elektrophorese für niedermolekulare Peptide

Beim konventionellen Tris-Glycin-Cl<sup>-</sup>-System ist die Auflösung von Peptiden < 10 kDa ungenügend. Das Problem ist durch die Entwicklung eines speziellen Gel- und Puffersystems von Schägger und von Jagow (1987) gelöst worden. Dabei wird die Molarität des Gelpuffers (pH 7,4) auf 1 mol/L erhöht und anstelle von Glycin das Tricin als Folgeion eingesetzt. Das Trenngel enthält 16%T und 6% C. Mit dieser Methode erhält man eine lineare Auflösung von 1–100 kDa.

Wiltfang *et al.* (1991) haben ein alternatives multiphasisches Puffersystem für die Trennung von Proteinen im Bereich zwischen 1 und 100 kDa entwickelt, bei

welchem Bicin als Folgeion, Sulfat als Leition, und BisTris und Tris während der Stacking- bzw. der Trennungsphase als Gegenionen verwendet werden. Diese Methode bietet ein hohes Auflösungsvermögen für spezielle Moleküle, die ansonsten schlecht zu trennen sind, z. B. der  $\beta$ -Amyloid-Peptide.

### Problematische Proteintypen

**Hochmolekulare Proteine und Proteinmultimere:** Wenn die SDS-Protein-Mizellen zu groß für die Poren von Polyacrylamidgelen sind, kann die SDS-Elektrophorese auch in Agarosegelen durchgeführt werden, wie z. B. beim von Willebrand-Faktor (Ott *et al.*, 2010).

**Glykoproteine:** Glykoproteine wandern bei der SDS-Elektrophorese relativ zu langsam, weil der Zuckeranteil kein SDS bindet. Bei Verwendung eines Tris-Borat-EDTA-Puffers werden auch die neutralen Zuckeranteile negativ geladen, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit entsprechend erhöht wird (Poduslo, 1981).

**PEGyierte Proteine:** Spezielle Formen von synthetischem Erythropoietin (EPO) enthalten Polyethylenglycol (PEG) und können deshalb mit SDS-PAGE nicht mit der gleichen Empfindlichkeit detektiert werden wie Erythropoietin ohne PEG, weil SDS sowohl an die Proteine als auch an die PEG-Reste bindet. Dies verursacht Probleme bei der Dopingkontrolle, wo synthetisches Erythropoietin vom körpereigenen Hormon in Humanurinproben differenziert werden muss. Der generell verwendete Anti-EPO-Antikörper kann nicht mit den komplett mit SDS beladenen PEGyierten Molekülen interagieren. Reichel *et al.* (2009) haben SDS durch Sarcosyl ersetzt, das nur an den Proteinanteil und nicht an den PEG-Anteil bindet, und haben damit einen Weg gefunden, auch diese modifizierten Proteine zu detektieren.

### Mobilitätsverschiebungs-SDS-PAGE

Die Detektion von phosphorylierten mittels Protein-Mobilitätsverschiebung in einer Phosphataffinität SDS-PAGE wurde von Kinoshita *et al.* (2006) entwickelt. Hierzu werden Manganchlorid/Zinkchlorid-Teilchen (*Phos-tag*) in die Polyacrylamidmatrix des Trenngels eingepolymerisiert. Phosphorylierte Proteine interagieren mit diesen Phos-tags während sie durch das Gel wandern. Dadurch wird die Wanderungsgeschwindigkeit der phosphorylierten Proteine verringert, sodass man eine Trennung der phosphorylierten von der nicht phosphorylierten Form erhält. Die getrennten Proteine können mit Western Blotting oder MALDI-TOF-Massenspektrometrie weiter charakterisiert werden.

### Zymographie SDS-PAGE

Für die Zymographie-Detektion wird ein Substrat (z. B. Gelatine, Casein, Albumin, Hämoglobin etc.) in die Polyacrylamidgelmatrix für die SDS-PAGE mit eingepolymerisiert (Lantz und Ciborowski, 1994). Diese Methode wird in Kapitel 6 (Detektion) weiter erklärt.

#### 1.3.4.4 Elektrophorese mit kationischem Detergens

Stark saure Proteine binden kein SDS. Auch bei der Analyse von stark basischen Nukleoproteinen, die sich in SDS-Gelen sehr ungewöhnlich verhalten, wird als Alternative die Elektrophorese mit dem kationischen Detergens Cetyltrimethylammoniumbromid, kurz CTAB, im sauren Puffersystem bei pH 3–5 empfohlen (Eley *et al.*, 1979). Auch dies ergibt eine Trennung nach Molekulargrößen, aber in Richtung Kathode. Das Trennmuster unterscheidet sich von dem mit SDS-Elektrophorese, weil die Detergens-Protein-Mizellen unterschiedlich strukturiert sind. Das kationische Detergens schädigt die Aktivität von Proteinen weit weniger als SDS, sodass man die CTAB-Elektrophorese als eine Form der Nativelektrophorese einsetzen kann (Atin *et al.*, 1985). Buxbaum (2003) hat berichtet, dass Membranglykoproteine erheblich besser mit einer sauren CTAB-PAGE als mit SDS-PAGE getrennt werden. Alternativ hierzu kann Benzylidimethyl-*n*-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC) als kationisches Detergens eingesetzt werden (MacFarlane, 1983). Kramer (2006) hat ein diskontinuierliches Puffersystem mit verbessertem Protein-Stacking für 16-BAC-Elektrophoresen entwickelt.

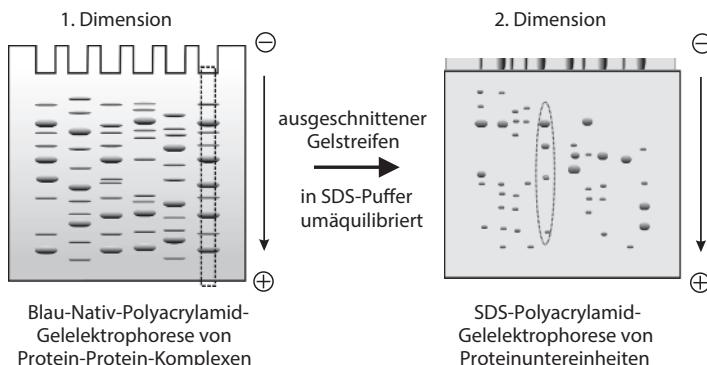
#### Wichtig

Für saure Gele benötigt man für die Polymerisation die alternativen Katalysatoren nach Jordan und Raymond (1969).

#### 1.3.4.5 Blau-Nativ-Elektrophorese

*Membranproteine* und Proteinkomplexe: Wenn man Membranproteine mit nicht ionischen Detergenzien solubilisiert, würden sich zusammen mit SDS störende Mischmizellen bilden. Schägger und von Jagow (1991) haben deshalb die *Blau-Nativ-Elektrophorese* (BNE) von Membranproteinkomplexen entwickelt: Nach der Solubilisierung der Komplexe mit einem milden Detergens wie Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid oder Digitonin wird vor der Elektrophorese der anionische Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 zur Probe zugegeben. Er bindet an die Komplexe ohne die Protein-Protein-Wechselwirkungen zu beeinflussen. Die anschließende native Polyacrylamidgelektrophorese wird unter physiologischen Bedingungen durchgeführt: pH 7,5 und 4 °C. Auch der Kathodenpuffer enthält den Coomassie-Blau-Farbstoff. Auf diese Weise werden Membranproteine und Proteinkomplexe in enzymatisch aktiver Form isoliert.

Während des Laufes konkurriert der Farbstoff mit dem nicht ionischen Detergens, bindet an die Membranproteine und Komplexe und verleiht ihnen negative Ladungen analog zu SDS. Alle Protein-Farbstoff-Komplexe wandern zur Anode, auch die ursprünglich basischen Proteinkomplexe. Sie bleiben in dem detergensfreien Puffer in Lösung und – da die negativ geladenen Proteinmizelloberflächen sich gegenseitig abstoßen – Aggregierungen zwischen Proteinen werden minimiert. Blau-Nativ-PAGE-Gele enthalten normalerweise einen Porengradienten von 5–16 % *T*: Das ermöglicht die Einwanderung von großen Superkomplexen,



**Abb. 1.27** Prinzip der zweidimensionalen Elektrophorese mit Blau-Nativ-PAGE in der ersten und SDS-PAGE in der zweiten Dimension.

verhindert, dass kleine Komplexe und Einzelproteine aus dem Gel wandern, und erzeugt einen Bandenschärfungseffekt. Die blau gefärbten nativen Proteine sind gut sichtbar und können von ausgeschnittenen Gelstückchen elektroeluiert werden. In den meisten Fällen wird aber die Blau-Nativ-PAGE mit einer zweiten Dimension kombiniert, entweder mit einer zweiten Blau-Nativ-PAGE nach einer Äquilibrierung mit einem weniger milden Detergens, oder mit einer SDS-PAGE für die Darstellung der zugehörigen Untereinheiten (siehe Abb. 1.27). Nach der zweiten Dimension erfolgt die Visualisierung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blau, Silberfärbung, Fluoreszenzfärbung oder Zymogrammtechniken (Letzteres nur nach einer zweiten Nativ-Blau-PAGE). Es ist auch möglich, die Proteinkomplexe vor der ersten Dimension mit CyDye-Fluorophoren zu markieren. Sollte das Coomassie Blau Probleme bei Zymogrammtechniken oder der Fluoreszenzdetektion verursachen, kann man auch die *clear native* (CN) PAGE ohne den Farbstoff versuchen (Wittig und Schägger, 2005), allerdings mit niedrigerem Auflösungsvermögen.

Detailliertere Informationen und wertvolle Hinweise zu Problemlösungen findet man in dem umfangreichen Übersichtsartikel von Wittig *et al.* (2006). Im gleichen Jahr ist ein weiterer Übersichtsartikel von Krause erschienen, in welchem viele Anwendungen dieser Technik zusammengestellt wurden.

Vor kurzem sind ein paar Modifikationen der Methode publiziert worden: Strecker *et al.* (2010) haben den Trennbereich erweitert, um Megaproteinkomplexe größer als 10 MDa mit ins Gel zu bekommen; hierfür werden Polyacrylamidgele mit einem hohen Vernetzungsgrad verwendet. Weitere Einsichten in die innere Architektur von Proteinkomplexen erhält man durch die Behandlung von biologischen Proben mit niedrigen SDS-Konzentrationen vor der Nativ-elektrophorese. Die teilweise zerfallenen Proteinkomplexe können unter sehr exakten und reproduzierbaren Bedingungen mit der zweidimensionalen Blau-Nativ-PAGE/SDS-PAGE untersucht werden (Klodmann *et al.*, 2011).

### 1.3.4.6 Rehydratisierte Polyacrylamidgele

*Horizontale (Flachbett-)Elektrophorese:* Das Horizontalsystem hat, bei Verwendung ultradünner Gelschichten, die auf Trägerfolie aufpolymerisiert werden, eine Reihe von Vorteilen gegenüber Vertikalsystemen (Görg *et al.*, 1980): einfache Handhabung, einfacher Einsatz von Fertiggelen und fertigen Pufferstreifen statt großer Puffervolumina, gute Kühlleffektivität und Temperaturkontrolle, einfache Automatisierbarkeit.

Bei Verwendung von Gelschichten mit weniger als 1 mm Dicke erhält man bessere Auflösung als mit dickeren Gelen. Die Vorteile dünnerer Gele sind:

- schnellere Trennung,
- schärfere Banden,
- schnellere Färbung,
- bessere Effektivität der Färbung,
- höhere Empfindlichkeit.

Außerdem kann man trägerfoliengestützte dünne Gele, die im Horizontalsystem verwendet werden, waschen, trocknen und rehydratisieren (siehe auch Kapitel 3, Isoelektrische Fokussierung).

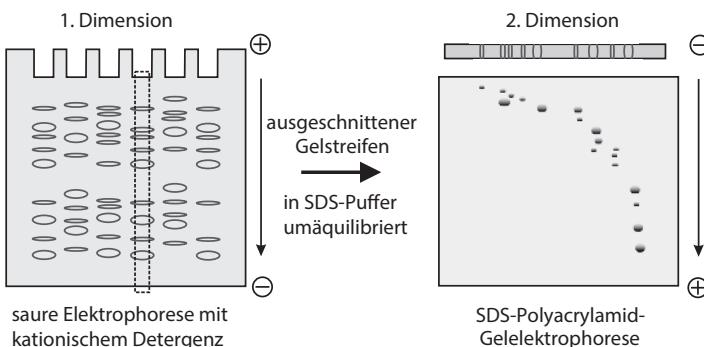
*Nativelektrophorese in amphoteren Puffern:* Aus trägerfoliengestützten Polyacrylamidgelen kann man die Polymerisationskatalysatoren mit entionisiertem Wasser auswaschen. Durch Äquilibrierung in amphoteren Puffern, wie z. B. HEPES, MES oder MOPS, ergibt sich ein weites Spektrum für den Einsatz von Elektrophoresen unter nativen Bedingungen. Diese Methode ist gut geeignet für saure Elektrophoresen der basischen hydrophoben Gerstenhordeine (Hsam *et al.*, 1993) und basischen Fisch-Sarcoplasma-Proteinen (Rehbein, 1995). Die ionischen Katalysatoren APS und TEMED würden solche Puffersysteme destabilisieren (siehe Methode 4 in Teil II).

Interessanterweise erhält man bei der SDS-Elektrophorese mit dem klassischen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem in gewaschenen Gelen schlechte Ergebnisse. Aber das Tris-Acetat/Tris-Tricin-Puffersystem funktioniert darin gut. Hierfür wird das getrocknete Gel mit Tris-Acetat-Puffer pH 8,0 in einer horizontalen Wanne rehydratisiert. Das Verhalten eines SDS-Puffersystems wird offensichtlich stark von der Anwesenheit der Katalysatoren und Acrylamidmonomeren im Gel beeinflusst.

### 1.3.4.7 Zweidimensionale Elektrophoresen

Mit der Kombination zweier verschiedener Elektrophoresemethoden werden unterschiedliche Ziele verfolgt:

- Elektrophoretisch fraktionierte Proteine werden mit einer anschließenden Affinitäts- oder Immunelektrophorese nach Laurell (1966) identifiziert, näher charakterisiert oder quantifiziert, z. B. durch Kreuzimmunelektrophorese nach Clarke und Freeman (1968). Dabei entstehen Präzipitatbogen, die den Zonen der ersten Dimension zugeordnet werden können.



**Abb. 1.28** Prinzip der zweidimensionalen Elektrophorese mit der sauren PAGE mit kationischem Detergents 16-BAC in der ersten und SDS-PAGE in der zweiten Dimension.

- Ein komplexes Proteingemisch wird erst mit einer Zonenelektrophorese aufgetrennt und dann mit IEF weiter separiert oder umgekehrt (Altland *et al.*, 1981).
- Hydrophobe Proteine, wie z. B. membrangebundene Proteine, werden erst in einem sauren Gel bei pH 2,1 in Gegenwart eines kationischen Detergents wie 16-BAC aufgetrennt und dann mit einer SDS-Elektrophorese (MacFarlane, 1989; Hartinger *et al.*, 1996). Da sich die Trennmuster bei 16-BAC und in SDS deutlich unterscheiden, ergibt sich eine annehmbare, wenn auch nicht perfekte Auflösung. Das Konzept ist in Abb. 1.28 gezeigt.
- Membranproteinkomplexe werden erst mit der Blau-Nativ-Elektrophorese aufgetrennt (siehe oben) und dann mit der SDS-PAGE zur Darstellung und Identifizierung der Komplexpartner.
- Hochkomplexe Proteingemische, wie z. B. Zelllysate oder Gewebeextrakte, sollen möglichst in sämtliche Einzelproteine fraktioniert werden, um ein Gesamtbild der Protein Zusammensetzung zu erhalten und einzelne Proteine auffinden zu können. Die höchste Auflösung erzielt man mit einer Kombination von zwei komplett orthogonalen Techniken: Auf trennung nach isoelektrischen Punkten und nach den Molekülgrößen.

Bei diesen Techniken führt man die erste Dimension in individuellen Rundgelen oder Gelstreifen durch und überträgt diese auf das Gel der zweiten Dimension. Man kann ein Flachgel nach der Trennung in Streifen schneiden und auf das zweite Gel transferieren. Die Kombination von Isoelektrischer Fokussierung und SDS-Elektrophorese wurde erstmals von Stegemann (1970) verwendet.

*Hochauflösende 2-D-Elektrophorese:* Erst der wichtige Beitrag von O'Farrell (1975) zur 2-D-Elektrophorese ermöglichte eine sehr hohe Auflösung von komplexen Proteingemischen: die Anwendung komplett denaturierender Bedingungen bei der Probenvorbereitung und in der ersten Dimension, der IEF. Die Probe wird mit einem sogenannten Lysepuffer (besser als Solubilisierungsmix bezeichnet), der aus einer gesättigten Harnstofflösung (9 mol/L) mit 2 % β-Mercaptoethanol zur Reduzierung und einem nicht ionischen Detergens (No-

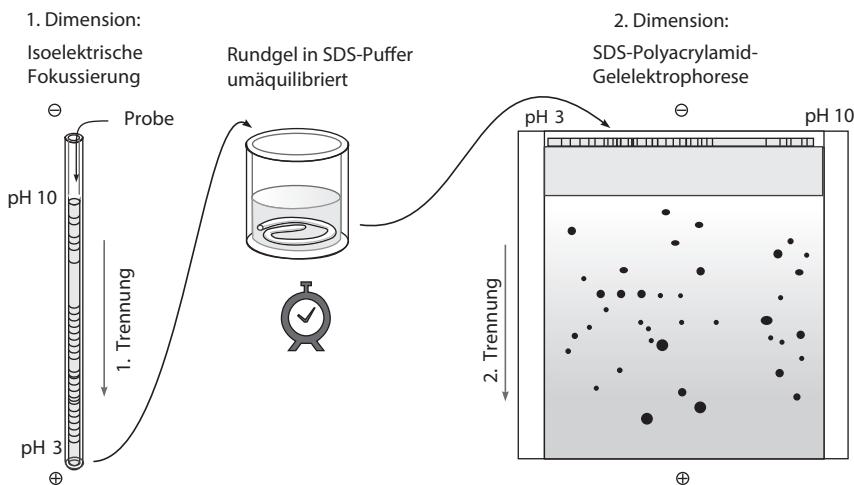


Abb. 1.29 Prinzip der Methode der hochauflösenden 2-D-Elektrophorese nach O'Farrell (1975).

ninet NP-40) zur Unterstützung der Löslichkeit besteht, in Lösung gebracht. Die erste Dimension, die Isoelektrische Fokussierung erfolgt in Gegenwart von 9 M Harnstoff und dem nicht ionischen Detergens, die zweite Dimension mit einer SDS-Elektrophorese. Dadurch werden Proteinkomplexe und -aggregate aufgeschlossen, wodurch sich die Auflösung stark erhöht. In der Originalarbeit von O'Farrell wurden Extraktproteine aus *Escherichia coli* mit <sup>14</sup>C oder <sup>35</sup>S markiert, und im Gel mit Autoradiografie detektiert. Diese Detektionsmethode besitzt einen sehr breiten dynamischen Bereich von bis zu fünf Größenordnungen. 1100 unterschiedliche Polypeptide konnten auf diese Weise detektiert werden. In Abb. 1.29 ist der traditionelle Arbeitsablauf für die hochauflösende 2-D-Elektrophorese gezeigt.

Seit die Proteinflecken mit neuen Methoden der Massenspektrometrie weiter analysiert werden können, hat diese Methode eine Renaissance erlebt: Die getrennten Proteine können nun identifiziert und weiter charakterisiert werden. Dieses Konzept nennt man „Proteome Analysis“ oder „Proteomics“ (Wasinger *et al.*, 1995) und ist detailliert im Buch „Proteomics in Practice“ (Westermeier *et al.*, 2008) beschrieben. Das Kapitel 4 im vorliegenden Buch ist ganz der 2-D-Elektrophorese gewidmet.

#### 1.3.4.8 GeLC-MS

Die Kombination von SDS-PAGE mit Umkehrphasenflüssigchromatografie (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPC) von tryptischen Peptiden und Electrospray-Ionisation (ESI) Massenspektrometrie ist zu einer weitverbreiteten Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung von „Proteomen“ geworden. Erst wird der gesamte Gewebeextrakt oder das gesamte Zelllysat mit SDS-PAGE aufgetrennt, um die Komplexität der Probe zu reduzieren. Die Gele werden nicht

gefärbt: Die Trennspuren werden direkt mit einem Gelschneider in bis zu 48 Gelstückchen zerteilt. Die darin befindlichen Proteine werden innerhalb der Gelstückchen mit Endoproteasen – meist Trypsin – verdaut, wie von Hellman *et al.* (1995) vorgeschlagen. Die Peptide lassen sich gut eluieren und werden in einer Umkehrphasenflüssigchromatografiesäule weiter aufgetrennt, die „Online“ mit einem ESI-Massenspektrometer gekoppelt ist. In den meisten Fällen werden die Peptide im Massenspektrometer weiter fragmentiert für MS/MS-Analysen zur Strukturaufklärung.

## Literatur

- Ahn, T., Yim, S.-K., Choi, H.-I. und Yun, C.-H. (2001) Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: Use of amino acids as electrolytes. *Anal. Biochem.*, **291**, 300–303.
- Altland, K., Rauh, S. und Hackler, R. (1981) Demonstration of human prealbumin by double one-dimensional slab gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **2**, 148–155.
- Anderson, B.L., Berry, R.W. und Telser A. (1983) A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis system that separates peptides and proteins in the molecular weight range of 2500 to 90 000. *Anal. Biochem.*, **132**, 365–275.
- Atin, D.T., Shapira, R. und Kinkade, J.M. (1985) The determination of molecular weights of biologically active proteins by cetyltrimethylammonium bromide-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **145**, 170–176.
- Bassam, B.J., Caetano-Annollés, G. und Gresshoff, P.M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **196**, 80–83.
- Bøg-Hansen, T.C. und Hau, J. (1981) Glycoproteins and glycopeptides. *J. Chromatogr. Libr. B*, **18**, 219–252.
- Bussard, A. und Huer, J. (1959) Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel: l'electrosynérèse. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 258–260.
- Buxbaum E. (2003) Cationic electrophoresis and electrotransfer of membrane glycoproteins. *Anal. Biochem.*, **314**, 70–76.
- Clarke, H.G.M. und Freeman, T. (1968) Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. *Clin. Sci.*, **35**, 403–413.
- Cohen, A.S. und Karger, B.L. (1987) High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. *J. Chromatogr.*, **397**, 409–417.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis, 2. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.*, **121**, 404–427.
- Eley, M.H., Burns, P.C., Kannapell, C.C. und Campbell, P.S. (1979) Cetyltrimethylammonium bromide polyacrylamide gel electrophoresis: Estimation of protein subunit molecular weights using cationic detergents. *Anal. Biochem.*, **92**, 411–419.
- Ferguson, K.A. (1964) Starch-gel electrophoresis – Application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism*, **13**, 985–995.
- Görg, A., Postel, W., Westermeier, R., Giannazza, E. und Righetti, P.G. (1980) Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing, and two-dimensional techniques in horizontal ultrathin polyacrylamide layers. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **3**, 273–284.
- Grabar, P. und Williams, C.A. (1953) Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques d'un mélange de protéines. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 193–194.
- Green, M.R. und Sambrook J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4. Aufl., Three-volume set Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gressner, A.M. und Arndt, T. (Hrsg.) (2013) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg.

- Hannig, K. (1982) New aspects in preparative and analytical continuous free-flow cell electrophoresis. *Electrophoresis*, **3**, 235–243.
- Hartinger, J., Stenius, K., Högemann, D. und Jahn R. (1996) 16-BAC/SDS PAGE: A two dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal. Biochem.*, **240**, 126–133.
- Hashimoto, F., Horigome, T., Kanbayashi, M., Yoshida, K. und Sugano, H. (1983) An improved method for separation of low-molecular weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.*, **129**, 192–199.
- Hedrick, J.L. und Smith, A.J. (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 155–163.
- Hellman, U., Wernstedt, C., Góñez, J. und Hedin, C.-H. (1995) Development of an improved „in-gel“ digestion procedure for the micro-preparation of internal protein fragments for amino acid sequencing and single print analysis. *Anal. Biochem.*, **224**, 451–455.
- Hjertén, S. (1962) „Molecular sieving“ chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method. *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, **1**, 147–151.
- Hjertén, S. (1983) High-performance electrophoresis: The electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **270**, 1–6.
- Hsam, S.L.K., Schickle, H.P., Westermeier, R. und Zeller, F.J. (1993) Identification of cultivars of crop species by polyacrylamide electrophoresis. *Brauwissenschaft*, **3**, 86–94.
- Ibel, K., May, R.P., Kirschner, K., Szadkowski, H., Mascher, E. und Lundahl, P. (1990) Protein-decorated micelle structure of sodium-dodecyl-sulfate protein complexes as determined by neutron scattering. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 311–318.
- Jordan, E.M. und Raymond, S. (1969) Gel electrophoresis: A new catalyst for acid systems. *Anal. Biochem.*, **207**, 205–211.
- Jovin, T.M., Dante, M.L. und Chrambach, A. (1970) Multiphasic buffer systems output. *Natl. Tech. Inf. Serv.*, 196 085–196 091, Springfield VA.
- Kerenyi, L. und Gallyas, F. (1972) A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations. *Clin. Chim. Acta*, **38**, 465–467.
- Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta, E., Takeyama, K. und Koike, T. (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell Proteom.*, **5**, 749–757.
- Kleine, B., Löffler, G., Kaufmann, H., Scheipers, P., Schickle, H.P., Westermeier, R. und Bessler, W.G. (1992) Reduced chemical and radioactive liquid waste during electrophoresis using polymerized electrode gels. *Electrophoresis*, **13**, 73–75.
- Klodmann, J., Lewejohann, D. und Braun, H.-P. (2011) Low-SDS blue native PAGE. *Proteomics*, **11**, 1834–1839.
- Kohn, J. (1957) A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin. Chem. Acta*, **2**, 297.
- Kramer, M.L. (2006) A new multiphasic buffer system for benzylidimethyl-n-hexadecylammonium chloride polyacrylamide gel electrophoresis of proteins providing efficient stacking. *Electrophoresis*, **27**, 347–356.
- Krause, F. (2006) Detection and analysis of protein–protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis*, **27**, 2759–2781.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lane, L.C. (1978) A simple method for stabilizing protein-sulphydryl groups during SDS-gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **86**, 655–664.
- Lantz, M.S. und Ciborowski, P. (1994) Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. *Methods Enzymol.*, **235**, 563–594.
- Laurell, C.B. (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, **15**, 45–52.

- MacFarlane, D.E. (1983) Use of benzylidemethyl-*n*-hexadecylammonium chloride („16-BAC“), a cationic detergent, in an acidic polyacrylamide gel electrophoresis system to detect base labile protein methylation in intact cells. *Anal. Biochem.*, **132**, 231–235.
- MacFarlane, D.E. (1989) Two dimensional benzylidemethyl-*n*-hexadecylammonium chloride – sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: A high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal. Biochem.*, **176**, 457–463.
- Maurer, R.H. (1968) *Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese*, de Gruyter, Berlin.
- Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **74**, 560–564.
- O'Farrell, P.H. (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007–4021.
- Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. NY Acad. Sci.*, **121**, 321–349.
- Ott, H.W., Griesmacher, A., Schnapka-Koepf, M., Golderer, G., Sieberer, A., Spannagl, M., Scheibe, B., Perkhofer, S., Will, K. und Budde, U. (2010) Analysis of von Willebrand factor multimers by simultaneous high- and low-resolution vertical SDS-agarose gel electrophoresis and Cy5-labeled antibody high-sensitivity fluorescence detection. *Am. J. Clin. Pathol.*, **133**, 322–330.
- Patton, W.F., Chung-Welch, N., Lopez, M.F., Cambria, R.P., Utterback, B.L. und Skea, W.M. (1991) Tris-tricine and Tris-borate buffer systems provide better estimates of human mesothelial cell intermediate filament protein molecular weights than the standard Tris-glycine system. *Anal. Biochem.*, **197**, 25–33.
- Perlman, D., Chikarmane, H. und Halvorson, H.O. (1987) Improved resolution of DNA fragments in polysaccharide-supplemented agarose gels. *Anal. Biochem.*, **163**, 247–254.
- Poduslo, J.F. (1981) Glycoprotein molecular-weight estimation using sodium dodecyl sulfate-pore gradient electrophoresis: Comparison of Tris-glycine and Tris-borate-EDTA buffer systems. *Anal. Biochem.*, **114**, 131–139.
- Radola, B.J. (1975) Isoelectric focusing in layers of granulated gels II. Preparative isoelectric focusing. *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 181–185.
- Radola, B.J. (1980) Ultra-thin-layer isoelectric focusing in 50–100 µm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. *Electrophoresis*, **1**, 43–56.
- Raymond, S. und Weintraub, L. (1959) Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, **130**, 711–711.
- Rehbein, H. (1995) Differentiation of scombrid fish species (tunas, bonitos and mackerels) by isoelectric focusing, titration curve analysis and native polyacrylamide gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. *Electrophoresis*, **16**, 820–822.
- Reichel, C., Abzieher, F. und Geisendorfer, T. (2009) SARCO-SYL-PAGE: A new method for the detection of MIRCERA and EPO-doping in blood. Published online in Wiley Interscience, 16.12.2009 ([www.drugtestinganalysis.com](http://www.drugtestinganalysis.com)), doi:10.1002/dta.97
- Rickwood, D. und Hames, B.D. (1982) *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids*, IRL Press Ltd.
- Righetti, P.G. (1983) *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Rothe, G.M. (1994) *Electrophoresis of Enzymes*, Springer, Berlin.
- Rothe, G.M. und Purkhanbaba, M. (1982) Determination of molecular weights and Stokes' radii of non-denatured proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. 1. An equation relating total polymer concentration, the molecular weight of proteins in the range of 10<sup>4</sup>–10<sup>6</sup>, and duration of electrophoresis. *Electrophoresis*, **3**, 33–42.
- Samso, M., Daban, J.R., Hansen, S. und Jones, G.R. (1995) Evidence for sodium dodecyl sulfate/protein complexes adopting a necklace structure. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 818–824.
- Sanger, F. und Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by the primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **94**, 441–448.

- Schägger, H. und von Jagow, G. (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.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **199**, 223–231.
- Scherz, H. (1990) Thin-layer electrophoretic separation of monosaccharides, oligosaccharides and related compounds on reverse phase silica gel. *Electrophoresis*, **11**, 18–22.
- Schulze, P., Link, M., Schulze, M., Thueremann, S., Wolfbeis, O.S. und Belder, D. (2010) A new weakly basic amino-reactive fluorescent label for use in isoelectric focusing and chip electrophoresis. *Electrophoresis*, **31**, 2749–2753.
- Schwarzer, J., Rapp, E. und Reichl, U. (2008) N-glycan analysis by CGE-LIF: Profiling influenza A virus hemagglutinin N-glycosylation during vaccine production. *Electrophoresis*, **29**, 4203–4214.
- Schwartz, D.C. und Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, **37**, 67–75.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E. und Maizel, J.V. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815–822.
- Smithies, O. (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61**, 629–641.
- Stegemann H. (1970) Proteinfraktionierungen in Polyacrylamid und die Anwendung auf die genetische Analyse bei Pflanzen. *Angew. Chem.*, **82**, 640.
- Strecker, V., Wumaier, Z., Wittig, I. und Schägger H. (2010) Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: Isolation of putative respiratory strings or patches. *Proteomics*, **10**, 3379–3387.
- Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. und Ando, T. (1984) Electrophoretic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.*, **64**, 111–113.
- Tiselius, A. (1937) A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 524–531.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. und Humphrey-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, **16**, 1090–1094.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406–4412.
- Weinberger, R. (Hrsg.) (2000) *Practical Capillary Electrophoresis*, 2. überarbeitete Aufl., Academic Press, San Diego.
- Welsh, J. und McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7213–7218.
- Westerhuis, W.H., Sturgis, J.N. und Niederman, R.A. (2000) Reevaluation of the electrophoretic migration behavior of soluble globular proteins in the native and detergent-denatured states in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **284**, 43–52.
- Westermeier, R., Naven, T. und Hoepker, H.R. (2008) *Proteomics in Practice. A Guide to successful Experimental Design*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. und Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6531–6535.
- Wiltfang, J., Arold, N. und Neuhoff, V. (1991) A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100 000–1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis*, **12**, 352–366.
- Wittig, I. und Schägger, H. (2005) Advantages and limitations of clear native polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics*, **5**, 4338–4346.
- Wittig, I., Braun, H.-P. und Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nat. Protoc.*, **1**, 419–428.

