

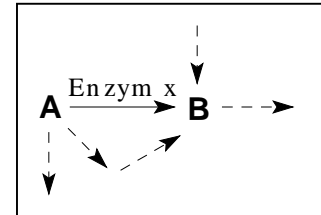
Grundlagen der Proteinreinigung

I. Warum reinigt man überhaupt Enzyme?

Detaillierte Studien über die Wirkungsweise eines Enzyms führen erst dann zum Erfolg, wenn es gelingt das Protein zu isolieren und von den hunderten anderen Proteinen einer Leberzelle, einer Hefe oder eines Bakteriums zu trennen. Um beispielsweise die durch Enzym x katalysierte Umsetzung von Verbindung A nach Verbindung B eindeutig zu charakterisieren bedarf es der Entfernung aller Aktivitäten, die ebenfalls Einfluß auf A und B nehmen (gestrichelte Pfeile).

Nur Umsätze von Verbindung A mit homogenen Enzym x ermöglichen einen zweifelsfreien quali- und quantitativen Nachweis von Produkt B und seiner Bildungsgeschwindigkeit.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und der N-terminalen Sequenz, Kristallisationsversuche zur Röntgenstrukturaufklärung, massenspektrometrische Untersuchungen und zahlreiche weitere Techniken der Proteincharakterisierung erfordern ebenfalls homogenes Protein.



Otto Warburg legte mit zahlreichen inspirierenden Veröffentlichungen (1930) und Techniken den Grundstein zur Disziplin der Enzymreinigung. Seitdem hat sich das Repertoire an Methoden sprunghaft entwickelt, wobei der Schwerpunkt des letzten Jahrzehntes vorrangig in der Miniaturisierung, Automatisierung und Optimierung bekannter Prinzipien lag.

Meßlatte jeder Enzymreinigung ist das Erreichen der maximal möglichen spezifischen Aktivität, des Verhältnisses von Aktivität zu Proteinmenge. Mit jedem erfolgreichen Reinigungsschritt sollte dieses Verhältnis zunehmen, bis es schließlich mit der homogenen Enzympräparation einen Maximalwert erreicht. In der Praxis trübt jedoch ein mit der Reinigung oftmals einhergehender Aktivitätsverlust des Enzyms die theoretisch zu erwartende Zunahme des Anreicherungsfaktors.

Der Verlust katalytischer Aktivität ist die häufigste unerwünschte Begleiterscheinung. Sie ist der Grund dafür, daß Enzymaufreinigungen in der Regel zügig durchgeführt werden müssen. Einmal aus dem schützenden physiologischen Zustand des Zellinneren befreit, geraten Enzyme während Aufreinigungen häufig in Kontakt mit hohen Ionenkonzentrationen, absorbierenden Glasoberflächen, erhöhten Temperaturen, Metallen, Sauerstoff und weiteren potentiell schädlichen Einflüssen. Alle diese Faktoren führen häufig dazu die fragile Struktur von Enzymen irreversibel zu denaturieren. Enzyme sollten also nicht als stabile chemische Verbindungen angesehen werden sondern vielmehr als labile Biomoleküle, welche beim Umgang besondere Aufmerksamkeit erfordern.

Ein schmutziges, nicht ausreichend gereinigtes Glasbehältnis an dem noch Spuren eines Tensids oder eines Metallsalzes haften können die Aktivität irreversibel zerstören und so möglicherweise tage-, wochen- oder monatelange Arbeit mit einem Schlag zunichte machen.

II. Anzucht, Ernte und Herstellung von Extrakten prokaryotischer Zellen

a) Anzucht

Dem Zellaufschluß geht die Anzucht und Ernte der entsprechenden Organismen voraus. Bei der Auswahl des Substrates und der Wachstumsbedingungen muß als erstes gewährleistet sein, daß das gewünschte Enzym induziert und exprimiert wird.

Pseudomonas putida wächst auf NB-Komplexmedium zwar hervorragend, exprimiert auf diesem Nährmedium allerdings keinerlei Enzyme des Aromatenabbaus. Erst bei Wachstum auf Benzoat als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle oder zumindest in dessen Gegenwart werden Enzyme wie Brenzkatechin-1,2-Dioxygenase oder Muconat-Cycloisomerase induziert.

b) Ernte

Entscheidend ist weiterhin, daß die Zellen zu einem Zeitpunkt geerntet werden, an dem die Expression und somit die Konzentration des gewünschten Proteins maximal ist. Bei metabolischen Enzymen ist dies meist während der exponentiellen Wachstumsphase der Fall. Um gleichzeitig eine maximale Zellausbeute zu erzielen wird normalerweise in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet (Abb. 1).

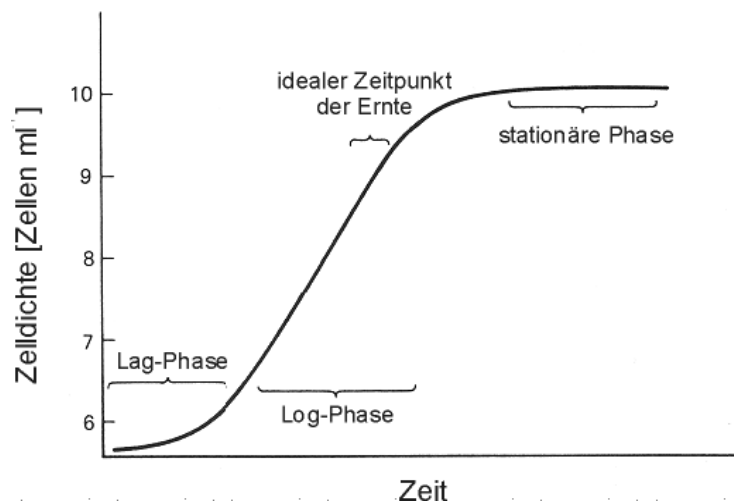


Abb. 1: Die Phasen des Wachstums von Mikroorganismen in Batch-Kultur und die günstigste Erntephase

Die Ernte von Zellen erfolgt durch Zentrifugation. Dieser und alle folgenden Schritte der Proteinreinigung sollten nach Möglichkeit gekühlt (+4°C) erfolgen, um Aktivitätsverluste zu minimieren. Durch mehrfaches Waschen (= Resuspendieren und erneutes Abzentrifugieren) des Zellpellets mit dem für den späteren Zellaufschluß geeigneten Puffer wird verhindert, daß Reste des Kulturmediums mitgeschleppt werden, welche die spätere Reinigung oder Stabilität des Proteins negativ beeinflussen. Der Wahl des Aufschlußpuffers und eventueller stabilisierender Additive kommt eine hohe Bedeutung zu. Das zu reinigende Protein sollte in seiner Aktivität und Stabilität durch den Puffer nicht negativ beeinflusst werden (z.B. durch Komplexbildung von Metallen oder Cofaktoren). Hohe Pufferkonzentrationen sollten vermieden werden, da sie bei späteren chromatographischen Schritten in der Regel stören. Außerdem sollten in Vorversuchen verschiedene Additive auf ihre potentielle Schutzwirkung getestet werden. Beispiele sind Phenylmethylsulfonylfluorid und das reduzierend wirkende Dithiothreitol (DTE) als Proteasehemmer bzw. Antioxidationsmittel. Auch kann die Zugabe bestimmter Metallionen auf die Aktivität stabilisierend wirken (z.B. Mn^{2+} bei Muconat-Cycloisomerase).

Können geerntete Zellen nicht direkt weiterverarbeitet werden oder ist die benötigte Zellmenge nur über einen längeren Zeitraum zu gewinnen kann bei -20 bis -70°C gelagert werden. Lagerung bedeutet jedoch zumeist Aktivitätsverlust und ist falls möglich zu vermeiden.

c) Zellaufschluß

Der Zellaufschluß zur Herstellung zellfreier Lysate ist der einleitende Schritt im Anreicherungsprozeß von Proteinen. Da er nicht zuletzt Einfluß auf die Gesamtmenge des anzureichernden Proteins, seine biologische Aktivität, seine Unversehrtheit gegenüber proteolytischen Verdau, seine Assoziation mit anderen zellulären Bestandteilen sowie auf die Anwesenheit zusätzlicher Kontaminationen hat, kommt der verwendeten Methode eine wichtige Bedeutung zu. Man unterscheidet generell zwischen Methoden der enzymatischen Lyse und denen der mechanischen Lyse.

Methoden der enzymatischen Zellyse basieren auf dem Verdau von Zellwandkomponenten (Peptidoglykan-Gerüst) der Zellwand beispielsweise durch Lysozym. Die freigelegten hochsensiblen Protoplasten werden anschließend durch Detergentien, osmotischem Schock, oder mechanische Behandlung geöffnet.

Enzymatische Methoden der Zellyse minimieren die Proteindenaturierung, funktionieren unabhängig von der Größe des Ansatzes und erlauben in bestimmten Fällen eine gewisse Selektivität im Freisetzen zellulärer Komponenten. Nachteile sind eine Vielzahl von Faktoren, die den Erfolg der Lyse beeinflussen können und zum anderen der Zusatz von Substanzen, welche mit späteren Reinigungsschritten interferieren können.

Methoden der mechanischen Zellyse beinhalten Verfahren des Schüttelns mit gleichzeitiger Schürfung und Verfahren der Scherung.

Im Rahmen der Schüttelmethode wird eine Zellsuspension in einer geschlossenen Kammer zusammen mit feinen Glasperlen unter hoher Frequenz geschüttelt (Schwingmühle). Die Wucht des Aufpralls der Perlen sowie gleichzeitig auftretende Scherkräfte fragmentieren die Zellen. Für eine ausreichende Kühlung ist Sorge zu tragen.

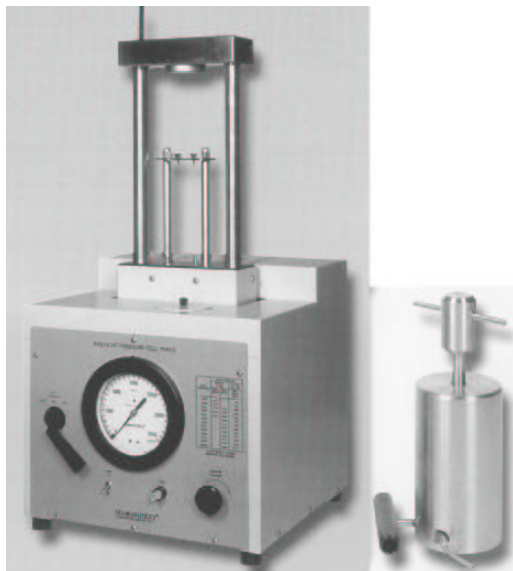


Abb. 2: French-Press mit kleiner Aufschlußzelle

Eine verbreitetes Gerät zur Zellöffnung durch Scherung in Flüssigphase ist die sog. French-Press. In ihr wird die Zellsuspension unter hohem Druck durch eine winzige Öffnung geleitet, hinter der es zur plötzlichen Entspannung und damit zum Auftreten starker Scherkräfte kommt. Variablen sind die Höhe des gewählten Druckes (7.000 bis 10.000 psi) und die Anzahl der Durchläufe. Ultraschall ist eine weitere verbreitete Methode der Zellöffnung. Eine Ultraschallsonde wird dabei direkt in die zu behandelnde Zellsuspension getaucht und Pulse von 30 bis 45 sec. Dauer erzeugt. Nachteil dieser Methode ist eine recht starke Wärmeentwicklung. Eine intensive Kühlung und das Arbeiten mit Pulsintervallen sind notwendig.

Die Vorteile der rein mechanischen Aufschlußmethoden liegen neben der Abwesenheit möglicherweise störender Additive insbesondere in den großen bearbeitbaren Zellmengen. Auch unterscheiden sich Zellen hinsichtlich der zur Öffnung notwendigen Parameter verhältnismäßig wenig.

Je nach gewählter Aufschlußmethode enthält das gewonnene Lysat mehr oder weniger chromosomale DNA. Ihre Entfernung ist aufgrund der hohen Viskosität und auf-

grund von Wechselwirkungen mit chromatographischen Reinigungsschritten notwendig und erfolgt im allgemeinen durch Zugabe von DNase. Die Entfernung unlöslicher Membran- und Zellwandbestandteile gelingt durch Ultrazentrifugation. Bei dem dabei erhaltenen klaren Überstand spricht man von zellfreiem Rohextrakt (englisch: cellfree crude extract).

III. Bestimmung von Proteingehalt und Aktivitäten zellfreier Enzyme

a) Aktivitätsbestimmung

Der spezifische Nachweis des anzureichernden Proteins im Rohextrakt sowie in Fraktionen chromatischer Trennungen geschieht mit Hilfe von Aktivitätsbestimmungen. Diese lassen sich je nach Vorgehensweise in kontinuierliche, gekoppelte und diskontinuierliche Nachweise einteilen.

Kontinuierliche Nachweise sind vom arbeitstechnischen Aufwand her die einfachsten. Bei ihnen kann die enzymatische Reaktion online photometrisch verfolgt werden, indem entweder die Abnahme des Substrates, die Zunahme des Produktes oder die Ab-/Zunahme eines erforderlichen Cosubstrates gemessen wird. Auch mit Hilfe geeigneter anderer Meßtechniken (Fluoreszenz, pH-Wert, Viskosität, Wärmeentwicklung) sind kontinuierliche Nachweise möglich.

Gekoppelte Nachweise werden dann erforderlich, wenn keine der an der Reaktion beteiligten Komponenten UV/VIS-spektroskopisch detektierbar ist. Durch Kopplung der Reaktion mit einer zweiten (oder dritten) Reaktion, welche ihrerseits einen chromophoren Reaktionsteilnehmer aufweist, kann unter gewissen Rahmenbedingungen auf die Geschwindigkeit der Ursprungsreaktion rückgeschlossen werden (Abb. 3).

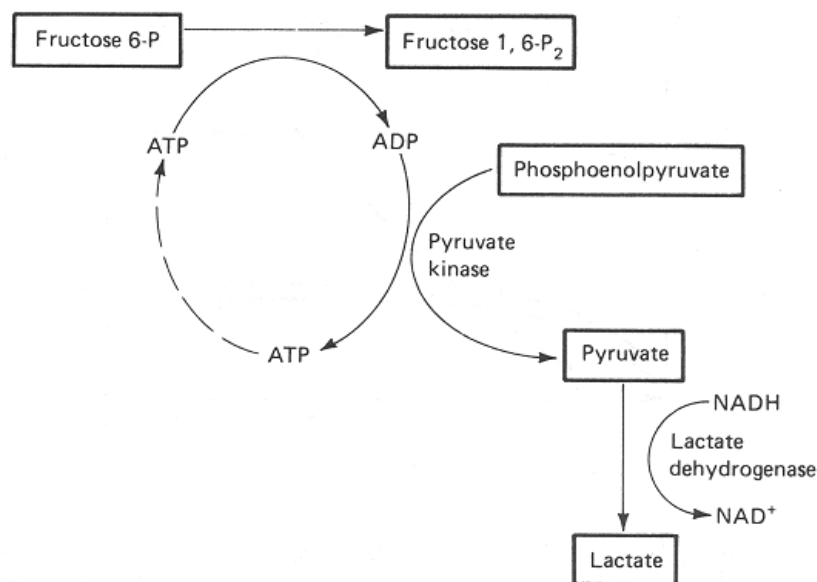


Abb. 3: Prinzip eines gekoppelten Enzymtests für Phosphofruktokinase mit Lactat-Dehydrogenase als Indikatorenzym (NADH-Abnahme wird gemessen)

Diskontinuierliche Nachweise erfordern die Isolation des Produkts aufgrund seiner speziellen Detektion (z.B. Nachweis von Radionukleiden, HPLC- und GC-Detektion). Um Umsatzgeschwindigkeiten zu bestimmen müssen mehrere Parallelumsätze zu unterschiedlichen Zeiten gestoppt („gequencht“) und jeweils die Konzentration an Substrat oder Produkt bestimmt werden.

Die Enzymaktivität wird beeinflusst durch die Konzentration der Substrate, von Aktivatoren, Inhibitoren, der Salzkonzentration, des pH-Wertes, der Ionenstärke und der Temperatur. Obwohl der Enzymtest unter optimierten Bedingungen abläuft ist die Berücksichtigung aller Faktoren in der Regel nicht notwendig.

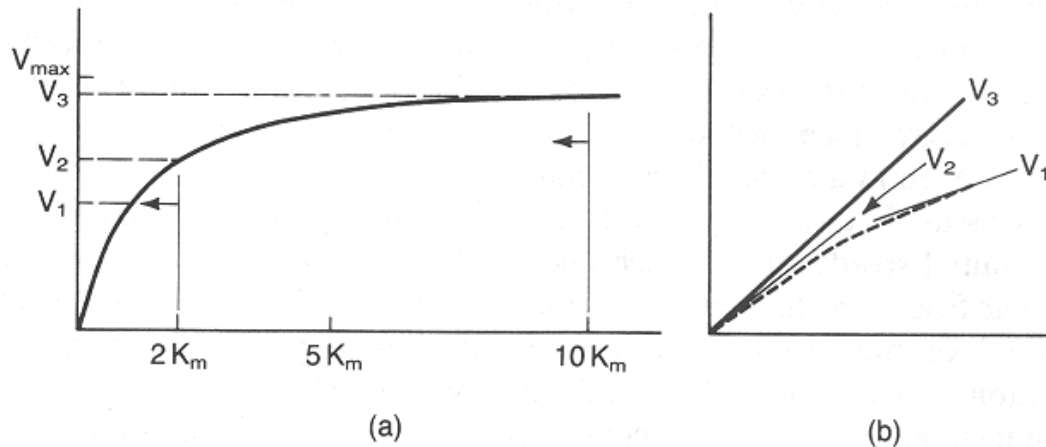


Abb. 4: Effekt des Substratverbrauchs auf die Enzymaktivität: (a) Abhängigkeit der Umsatzrate von Substratkonzentration; (b) gemessene Anfangsumsatzraten in Abhängigkeit der Substratkonzentration

Die Aktivität eines Enzyms ist formal bei unendlich hoher Substratkonzentration am höchsten (Abb. 4a), ein Umstand der nicht realisierbar ist. Gehorcht das Enzym der Michaelis-Menten-Kinetik, sollte die experimentell eingesetzte Substratkonzentration mindestens den 10-fachen Wert des k_m -Wertes des Substrates betragen. Die Geschwindigkeit sollte bei $[\text{Substrat}] = 10 \times k_m$ theoretisch 91% der maximal möglichen bei $[\text{Substrat}] = \infty$ betragen.

Die Verwendung hoher Substratkonzentrationen hat mehrere Vorteile; zum einen wirken sich auch größere Meßungenauigkeiten in der Substratzugabe nur relativ geringfügig auf die gemessene Umsatzgeschwindigkeit aus, zum anderen bewirkt die Substratabnahme zu Beginn der Reaktion keine merkliche Verringerung der Umsatzgeschwindigkeit (Abb. 4b). Auch sind inhibitorische Effekte von Produkten in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen geringer.

Als Grundlage der Aktivitätsbestimmung dient die gemessene Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, welche sich innerhalb der ersten Minute(n) nach Mischung aller Komponenten einstellt. Die Enzymprobe ist eventuell vorher so weit zu verdünnen, daß sich die Anfangsgeschwindigkeit noch bequem messen läßt, der Reaktionsverlauf also weder zu schnell noch zu langsam erfolgt. Von der gemessenen Aktivität ist eine eventuell zu beobachtende Blindreaktion zu subtrahieren. Eine Blindreaktion resultiert aus einer unspezifischen Abnahme des Substrates/Cosubstrates, beispielsweise durch Zerfall oder durch Reaktion mit anderen Enzymen der Proteinprobe.

Enzymaktivitäten werden meist in Enzymeinheiten (units, U) angegeben. Eine Enzymeinheit U wird definiert als die Aktivität, die den Umsatz von 1 μmol Substrat bzw. die Bildung von 1 μmol Produkt in einer Minute bei 25°C katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in Einheiten pro $\text{mg}_{\text{Protein}}$ angegeben ($\text{U}/\text{mg}_{\text{Protein}}$).

b) Proteinbestimmung

Neben der spezifischen Quantifizierung des gewünschten Enzyms durch Aktivitätsmessung ist die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes für die Ermittlung der spe-

zifischen Aktivität notwendig. Letztere gibt Auskunft über den Erfolg und die Effizienz eines Reinigungsschrittes.

Die gebräuchlichsten Methoden zur Proteinbestimmung sind:

- Biuret-Reaktion (relativ niedrige Empfindlichkeit 0,05-5 mg/ml)
- Lowry-Methode (empfindlich 0,05-0,5 mg/ml, störanfällig)
- UV-Absorption (einfachstes Meßprinzip, kein Probenverbrauch, 0,05-2 mg/ml (280 nm), 0,01-0,05 (205 nm))
- Farbstoff-Bindung (sehr empfindlich 0,01-0,05 mg/ml, sehr populär)
- BCA-Reagenz (sehr empfindlich 0,005-0,05 mg/ml, ähnlich der Lowry-Methode)

Die am häufigsten eingesetzte Farbstoff-Methode bedient sich dem Reagenz Coomassie Blau G-250. Das Reagenz ist in Säure gelöst und besitzt im protonierten Zustand eine rotbraune Farbe. Wenn es an positiv geladenen Proteinreste bindet schlägt die Farbe nach blau um und ist bei 595nm zu detektieren. Linearität ist nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich (ca. 1 – 10 µg Protein/ml) gegeben. Problematisch kann die Ablagerung blauer Farbstoffreste auf Küvettenoberflächen sein, da sie bei nachfolgenden Messungen zu hohe Meßwerte vortäuscht, die Verwendung von Einmal-Plastikküvetten ist daher vorteilhaft.

c) Zusammenfassung der Meßwerte

Der Verlauf von Anreicherungen wird zusammenfassend meist in Form einer Anreicherungstabelle dargestellt (Tab. 1).

Tab. 1: Typische Anreicherungstabelle einer Proteinreinigung
(hier: Maleylacetat Reduktase aus *Pseudomonas sp.* B13)

Reinigungsschritt	Gesamt- volumen [ml]	Gesamt- protein [mg]	Gesamt- Aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mgProt.]	Anreicherungs- faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	160	3200	12352	3,9	1	100
Ionenaustausch- Chromatographie	200	627	10214	16,3	4,2	83
Hydrophobe Interaktions- Chromatographie	55	45	7931	176,2	45,2	64
Affinitätschromatographie	75	7,9	4482	567,3	145,5	36
Gelfiltration	12	4,8	2798	582,9	149,5	23

IV. Präzipitations-Methoden

In den frühen Tagen der Proteinreinigung waren Präzipitationsmethoden von Proteinen, basierend auf Veränderung der Lösungseigenschaften die einzig verfügbare Strategie der Anreicherung. Dies hat sich bis heute in einigen ursprünglichen Proteinbezeichnungen niedergeschlagen hat (z.B. Globuline, Serumglobuline, Albumine, Prolamine).

Die Löslichkeit eines Enzyms in einem Lösungsmittel wird u.a. von der Verteilung hydrophiler (wasserliebender) und hydrophober (wasserabstoßender) Strukturmerkmale auf seiner Oberfläche bestimmt. Obwohl hydrophobe Strukturelemente bevorzugt im Inneren des Enzyms vorliegen, befindet sich (je nach Proteintyp) eine nicht unbedeutende Menge von ihnen auf der Oberfläche und gerät in Kontakt mit dem Lösungsmittel (Abb. 5A).

Das Lösungsmittel der Präzipitationsmethoden ist in den meisten Fällen Wasser. Die Lösungseigenschaften von Proteinen können durch Änderungen der Ionenstärke, des pH-Wertes, der Temperatur, durch Zugabe wasserlöslicher organischer Lösungsmittel, organischer Polymere oder einer Kombination verschiedener Faktoren verändert werden. Am gebräuchlichsten ist dabei die Verwendung neutraler Salze.

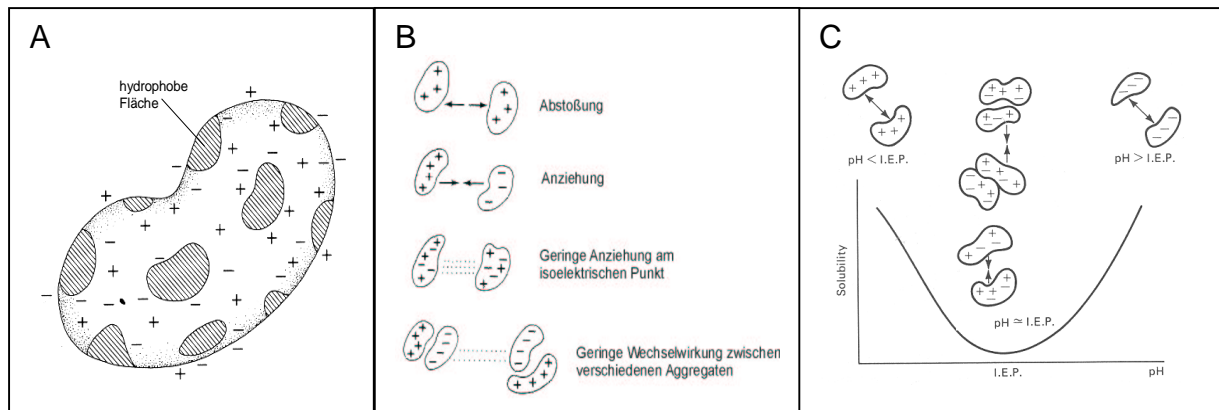


Abb. 5:A) Verteilung von Ladungen und hydrophoben Strukturen auf der Oberfläche eines typischen Enzyms
B) Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen und kleinen Aggregaten
C) Löslichkeit eines Proteins vom Globulin-Typ nahe seines isoelektrischen Punktes

a) Die Löslichkeit von Proteinen bei niedrigen Salzkonzentrationen

Die meisten Proteine liegen im Zellinneren in gelöster Form vor. Das Zytoplasma beinhaltet dabei eine hohe Konzentration verschiedenster Proteine ($\geq 40\%$) unter physiologischen Bedingungen (Ionenstärke 0,15 – 0,2 M, neutraler pH-Wert). Extrahiert man den Zellinhalt kann man diese Bedingungen verändern.

Die Löslichkeit eines Proteins ist das Resultat mehrerer Effekte:

- polarer Wechselwirkungen geladener Strukturelemente mit dem Lösungsmittel
- ionischer Wechselwirkungen mit gelöstem Salz
- abstoßender elektrostatischer Kräfte zwischen gleichgeladenen Molekülen oder kleinen Aggregaten (Abb. 5B)

Einige Enzyme (z.B. Globuline) bilden bereits Präzipitate, wenn die Ionenstärke des Mediums zwischen 0 und dem physiologischen Wert liegt. Dies kann zwei Ursachen haben:

- große hydrophobe Oberflächenanteile vermindern polare und ionische Wechselwirkungen mit Lösungsmittel bzw. Salz
- eine Nettoladung von Null (isoelektrischer Punkt) minimiert elektrostatische Abstoßung und begünstigt hydrophobe Wechselwirkungen untereinander

Proteine besitzen demnach ganz allgemein ihre geringste Löslichkeit im Bereich des isoelektrischen Punktes und lassen sich (ausreichend niedrige Löslichkeit vorausgesetzt) durch entsprechende pH-Änderung präzipitieren (Abb. 5C).

b) Proteinfällung durch Aussalzen bei hohen Salzkonzentrationen

Diese Technik ist die am häufigsten benutzte. Im Gegensatz zur „Salting in“-Methode welche wesentlich von der Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche und den dadurch resultierenden polaren Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel abhängt, beruht der „Salting-out“-Effekt primär auf dem Vorhandensein hydrophober Oberflächenstrukturen.

Ein geeignetes Modell zur Veranschaulichung ist folgendes: Wassermoleküle orientieren sich in direkter Nachbarschaft einer hydrophoben Oberfläche und bilden geordnete Hydrathüllen (Abb. 6). Dadurch wird die Annäherung und Assoziation zweier solcher hydrophober Oberflächen verhindert. In dem Maße wie nun Salz einem solchen System zugefügt wird werden die Wassermoleküle zur Hydratisierung der wesentlich polaren Ionen benötigt und zunehmend von der Proteinhülle abgezogen. Die freien hydrophoben Flächen können nun aggregieren, das Protein

fällt aus. Proteine mit einem höheren Anteil hydrophober Oberflächenstrukturen aggregieren bei steigender Salzkonzentration entsprechend früher.

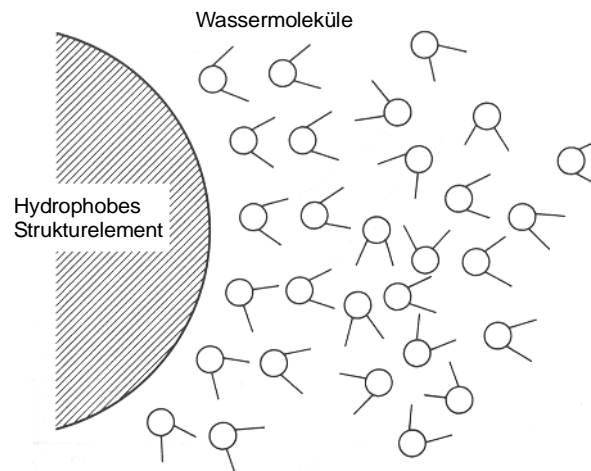


Abb. 6: Anordnung von Wassermolekülen um hydrophobe Oberflächenstrukturen

Die Art der Ionen spielt beim Aussalzen eine große Rolle. Günstig sind Salze aus mehrwertigen Anionen (Sulfat, Phosphat) und „unschädlichen“ Kationen (Ammonium, Kalium, Natrium). Ammoniumsulfat ist aus mehreren Gründen das am häufigsten benutzte ionische Fällungsmittel. Es ist ausreichend gut wasserlöslich (bis 4 M), zeigt keine signifikante Lösungswärme, hat in wässriger Lösung eine günstige Dichte (für das Abzentrifugieren von ausgefallenem Protein wichtig), stabilisiert Enzymaktivitäten und verhindert in konzentrierteren Lösungen mikrobielles Wachstum.

Für das Aussalzen von Proteinen existieren verschiedene Methoden. Ist das Volumen der Proteinlösung groß empfiehlt sich die Fällung mit festem Salz. Es wird in fein pulverisierter Form unter Rühren des gekühlten Fällungsansatzes portionsweise zugegeben, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist. Nach ausreichender Äquilibrierung wird Präzipitat und Lösung durch Zentrifugation getrennt und auf Aktivität untersucht. Bei einer fraktionierten Arbeitsweise wird der Überstand einer weiteren Salzzugabe unterzogen, erneut abzentrifugiert, usw.

Ist das Probenvolumen gering und spielt keine Rolle oder ist die zur Fällung notwendige Salzkonzentration niedrig ($\leq 50\%$ Sättigung) kann alternativ auch mit konzentrierter Salzlösung gefällt werden. Der Vorteil liegt in einer schnelleren Äquilibrierung und der Vermeidung von punktuellen Überkonzentrationen, wie sie zwangsläufig bei Zugabe von festem Salz entstehen.

Ein großer Vorteil der Ammoniumsulfat-Fällung ist die häufig beobachtete Stabilisierung von Enzymen. Ein 2–3 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -haltiges Enzympräzipitat behält seine Aktivität oftmals über Jahre unverändert (typische Handelsform von Enzymen). Soll eine Anreicherungsprozedur für längere Zeit unterbrochen werden, ist daher die Lagerung als Ammoniumsulfat-Präzipitat zu bevorzugen. Aufgrund der zum Fällen notwendigen hohen Konzentrationen an Ammoniumsulfat können sich Verunreinigungen mit Schwermetallen bereits im Spurenbereich auf die Enzymaktivität ungünstig auswirken. Eine Eliminierung gelingt durch Zugabe geringer Mengen EDTA.

c) Proteinfällung durch organische Lösungsmittel

Die Fällung von Proteinen durch wasserlösliche organische Lösungsmittel (z.B. Ethanol, Aceton, Methanol, *n*-Propanol) findet vergleichsweise geringe Anwendung. Da sie auf anderen Phänomenen beruht als die Fällung durch Aussalzen stellt sie eine zusätzliche Möglichkeit zur Anreicherung dar. Ein Vorteil von Was-

ser/Lösungsmittel-Gemischen ist die Möglichkeit des Arbeitens bei Temperaturen unter 0°C, was jedoch auch notwendig ist, da bei Temperaturen oberhalb 10°C Denaturierung signifikant wird.

d) Proteinfällung durch Denaturierung; Hitzefällung

Besitzt das aufzureinigende Enzym eine überdurchschnittliche Hitzestabilität auf ($\geq 50^\circ\text{C}$) ist die Hitzefällung eine außerordentlich einfache Möglichkeit der Anreicherung. Proteine, welche diese Temperatur nicht verkraften und koagulieren können abzentrifugiert werden.

V. Trennung durch Adsorption; Chromatographische Techniken

Proteine adsorbieren an eine Vielzahl fester Phasen, meistens in spezifischer Art und Weise. Der Einsatz adsorptiver Techniken insbesondere im Rahmen der Säulenchromatographie ist populär und liefert zumeist höchste Anreicherungen. Adsorptive Batch-Verfahren bieten zwar eine vergleichsweise schlechtere Auflösung, zeichnen sich aber durch einfachere und schnelle Durchführbarkeit aus und haben insbesondere bei großen Ausgangsmengen ihre Berechtigung.

Als spezifische Adsorptionsmittel für Proteine dienen:

- Ionenaustauscher
- Hydrophobe Materialien
- Anorganische Verbindungen (Calciumphosphat, Hydroxyapatit)
- Fixierte Liganden
- Affinitätsadsorptionsmittel (immobilisierte Substrate, Inhibitoren, Cofaktoren, Antikörper)

Zumeist sind diese Verbindungen auf einer Gelmatrix (Agarose-, Cellulosepartikel) immobilisiert. Letztere soll eine Auswaschung des Adsorbens verhindern, durch ihre Kugelform einen hohen Eluentenfluß gewährleisten und gleichzeitig eine hohe Oberfläche und damit Kapazität bieten. Weisen die Partikel zudem Poren auf, kann der daraus resultierende Molekularsiebeffekt eine zusätzliche Selektion bewirken.

a) Ionenaustauschchromatographie

Proteine binden an Ionenaustauscher aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen ihrer geladenen Oberfläche und den geladenen Resten des Ionenaustauschers, wobei es zur Verdrängung einer entsprechenden Menge an Gegenionen kommt (Abb. 7). Um ein Gefühl für die Größenordnung der Anzahl dieser Wechselwirkungen zu verdeutlichen: der durchschnittliche Abstand geladener Gruppen eines Diethylaminoethylcellulose-Ionenaustauschers (DEAE-Cellulose) beträgt ca. 1,5 nm, der Durchmesser eines globulären Proteins der Größe 30 kDa ungefähr 4 nm.

Aufgrund der potentiell hohen Proteinbindungskapazität bietet sich die Ionenaustauschchromatographie als einleitender Schritt einer Enzymanreicherung an. Allerdings hängt die Kapazität gegenüber einem bestimmten Protein wesentlich von seiner Größe ab. Je größer ein Protein ist, umso geringer ist seine Bindungskapazität. Besonders große Proteine ($> 10^6$ Da) binden allenfalls noch auf der Oberfläche, nicht aber in den Poren des Austauschers und werden ausgeschlossen (\rightarrow Trisacryl™).

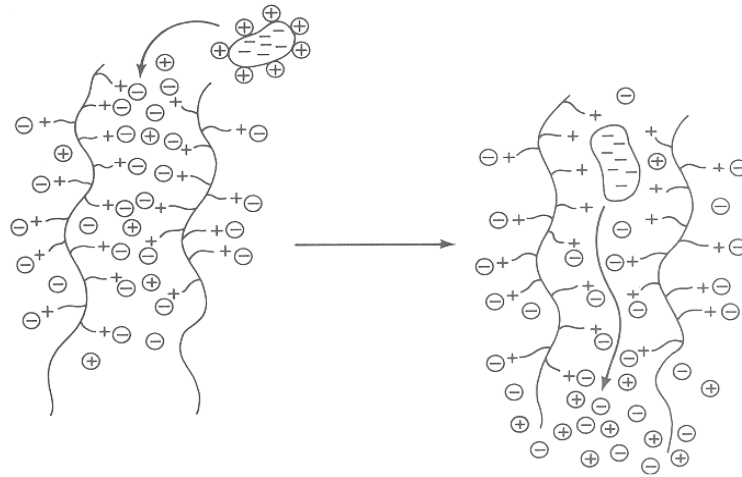


Abb. 7: Bindung eines negativ geladenen Proteins an einen Anionenaustauscher. Sieben positiv geladene Ionen (z.B. HTris+) die mit dem Protein assoziiert sind werden zusammen mit sieben negativen Gegenionen (Cl-) des Ionenaustauschers ausgetauscht.

Die beiden Entscheidungskriterien für die Wahl des Adsorbens sind:

- die Ladung, + oder – und die Natur der geladenen Gruppe
- die Art der Matrix (Teilchenform und -größe), Flußrate, Kapazität, Kosten

Die überwiegende Anzahl Proteine besitzen bei einem pH-Wert zwischen 7 und 8 eine negative Gesamtladung und lassen sich unter diesen Bedingungen mit einem Anionenaustauschermaterial adsorbieren.

Tab. 2: Wahl des Ionenaustauschers zur Reinigung eines Proteins mit bekanntem isoelektrischen Punkt

isoelektrischer Punkt	Ionen-austauscher	Puffer pH
8,5	kationisch	≤ 7,0
7,0	kationisch	≤ 6,0
	anionisch	≥ 8,0
5,5	anionisch	≥ 6,5

Der pH-Wert innerhalb eines Ionenaustauschers ist nicht identisch mit dem des Elutionspuffers. Verantwortlich hierfür ist der Donnan-Effekt, der die Adsorption und Freisetzung von Protonen aus der Matrix beschreibt. Generell ist der pH-Wert innerhalb von Anionenaustauschern um 1 Einheit höher, innerhalb von Kationenaustauschern um 1 Einheit niedriger. Der Unterschied ist dabei umso höher, je niedriger die Ionenstärke des verwendeten Puffers ist. Es ist daher generell ein Puffer zu wählen, der bei gegebener Ionenstärke die höchste Pufferwirkung besitzt. Der Donnan-Effekt muß im Hinblick auf das pH-Stabilitätsoptimum eines Enzyms berücksichtigt werden.

Die Elution eines gebundenen Proteins kann generell durch zwei Methoden erfolgen:

- Änderung des pH-Wertes des Eluenten (pH-Erniedrigung bei Anionenaustauschern, pH-Erhöhung bei Kationenaustauschern)
- Erhöhung der Ionenstärke des Eluenten (Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorbens)

Da die pH-Methode mit zahlreichen Schwierigkeiten und Einschränkungen verbunden ist, bedient man sich bis auf wenige Ausnahmen abgesehen der Hochsalzgradientenmethode, meist unter Einsatz von Natrium- und Kaliumchlorid.

Die desorptive Wirkung des Salzes kann zum Einen durch den Ionenaustauscheffekt erklärt werden (die Ionen des Salzes verdrängen die geladenen Proteinreste), zum Anderen schwächt die steigende Ionenstärke die zur Bindung notwendigen elektrostatischen Wechselwirkungen (siehe auch „salting out“).

b) Hydrophobe Interaktionschromatographie

Hydrophobe Wechselwirkungen besitzen große biochemische Bedeutung. Sie sind wesentlich an der Stabilisierung dreidimensionaler Tertiärstrukturen von Proteinen, an Antikörper-Antigen-Reaktionen und an Enzym-Substrat-Bindungsreaktionen beteiligt.

Unter hydrophober Interaktion versteht man das Phänomen, daß 2 hydrophobe Moleküle in einer polaren Umgebung (z.B. Wasser) spontan aggregieren. Treibende Kraft hierzu ist eine Zunahme an Entropie, welche thermodynamisch stets begünstigt ist. Daraus folgt, daß hydrophobe Interaktion keine Kraft *per se* ist, sondern allein durch eine polare Umgebung erzwungen wird.

Durch Lösen eines Salzes und Erhöhung der Ionenstärke des Mediums nimmt auch die hydrophobe Wechselwirkung zweier unpolarer Moleküle zu.

Proteine besitzen, mehr oder minder hohe Anteile hydrophober Oberflächenstrukturen. Bei entsprechend hoher Ionenstärke sind sie daher in der Lage sich an hydrophobe Adsorbentien zu heften. Die Stärke der Interaktion kann neben dem Salzgehalt durch die Wahl des Adsorbens gesteuert werden. Materialien mit geringer Hydrophobizität (verknüpfte Butylreste) werden bevorzugt für stark hydrophobe Proteine eingesetzt, Materialien mit hoher Hydrophobizität (z.B. Octylreste) entsprechend für gering hydrophobe Proteine. Gele mit Phenylresten sind in ihrer Hydrophobizität etwa in der Mitte einzuordnen und für die meisten Proteine geeignet.

Die Adsorption erfolgt in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, die Elution entsprechend mit einem absteigenden Salzgradienten. Für die Wahl der Ionen gelten die gleichen Kriterien wie für die Proteinfällung, Ammoniumsulfat ist das gebräuchlichste Salz.

c) Hydroxyapatit-Chromatographie, Affinitätschromatographie, Farbstoff-Liganden-Chromatographie, Immunoabsorption

Es wird auf allgemeine Literatur zur Proteinreinigung verwiesen (siehe Punkt VII.).

VI. Trennung in Lösung; Gelfiltration (Größenausschluß-Chromatographie), Elektrophoretische Methoden

a) Gelfiltration (Größenausschluß-Chromatographie)

Die Fraktionierung von Proteinen aufgrund von Größenunterschieden gibt der Gelfiltration eine Sonderstellung unter den chromatographischen Techniken zur Proteinreinigung. Der Ausdruck Gelfiltration ist unglücklich gewählt, da im Gegensatz zur üblichen Filtration keine Komponenten zurückgehalten werden. Die Abwesenheit adsorptiver Phänomene birgt die Vor- und Nachteile der Gelfiltration. Zum Einen werden empfindliche Proteine nicht durch Bindung beeinträchtigt, zum Anderen verschlechtert das Fehlen einer spezifischen Bindung die chromatographische Auflösung dieser Technik.

Gelfiltration erfordert eine poröse Gelmatrix möglichst genau definierter Porengröße (Abb. 8A). Eine Säule, welche mit solchen kugelförmigen Gelpartikeln gepackt ist, besitzt 2 unterschiedliche meßbare Flüssigkeitsvolumen. Das Ausschlußvolumen, welches dem Volumen der Flüssigkeit außerhalb und zwischen den Gelpartikeln

entspricht, und dem Einschlußvolumen, welches im wesentlichen der Flüssigkeit innerhalb der Gelpartikel entspricht.

Eine Mischung von Proteinen wird in einem möglichst kleinen Volumen auf die Oberfläche einer Gelfiltrationssäule aufgegeben und durch sie durchlaufen gelassen. Große Moleküle können nicht in die Poren diffundieren und wandern innerhalb des Ausschlußvolumens als erste durch die Säule. Kleine Proteine diffundieren in die porösen Gelpartikel und eluieren entsprechend später (Abb. 8B). Für die Trennung entscheidend ist also sowohl die Porengröße als auch der Durchmesser (Stokes Radius) des Proteins. Die zutreffendere Bezeichnung Größenausschluß-Chromatographie findet zunehmend Verwendung.

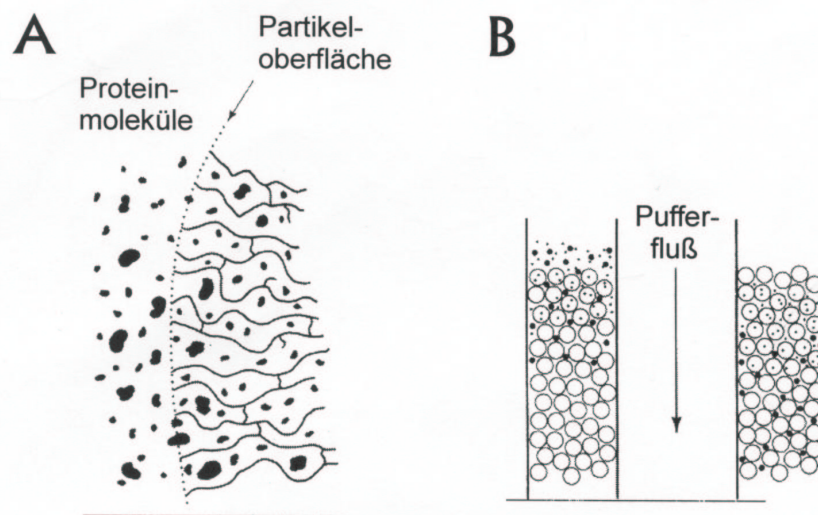


Abb. 8: Verlauf der Größenausschluß-Chromatographie

- A** Zweidimensionale Darstellung der Poren einer Gelpartikeloberfläche und ihrer Zugänglichkeit für Moleküle verschiedener Größe (keine realistischen Größenverhältnisse).
- B** Einfache Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs einer Größenausschluß-Chromatographie. Große Moleküle werden vom größten Teil des vorhandenen Bettvolumens ausgeschlossen und wandern nahezu ungehindert mit der Laufmittelfront.

Besitzen alle Proteine einer Mischung ähnliche kugelförmige Struktur entspricht die Reihenfolge der Elution ihrer reziproken Molekulargewichte.

Das Elutionsprofil einer Gelfiltration ist in Abb. 9A skizziert. Das Leer- oder Ausschlußvolumen V_0 der Säule wird durch Elution einer Verbindung mit sehr hohem Molekulargewicht (z.B. Dextranblau 2000 MW > 2 Mio.) ermittelt. Das Elutionsvolumen V_t für das kleinste Standardprotein entspricht der Summe aus Leervolumen V_0 und dem Einschlußvolumen der Gelpartikel. Elutionsvolumen von Proteinen zwischen diesen Grenzbereichen werden mit V_e bezeichnet.

Die Mobilität eines Proteins kann in Form seines Verteilungskoeffizienten K_{av} angegeben werden:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Die halblogarithmische Auftragung von K_{av} gegen das entsprechende Molekulargewicht (Abb. 9B) ergibt einen sigmoiden Verlauf. Die Auftrennung von Proteinen ist im linearen Bereich (K_{av} : 0,2 – 0,8) am größten, dieser Bereich wird deshalb auch als Trennungs- oder Fraktionierungsbereich einer Gelpartikel angegeben. Je steiler der sigmoide Bereich innerhalb des Fraktionierungsbereichs verläuft umso höher ist das Auflösungsvermögen des Säulenmaterials. Zur Auftrennung von Proteinen mit gerin-

gen Molekulargewichtsunterschieden wird Material mit möglichst kleinem Fraktionierungsbereich benutzt.

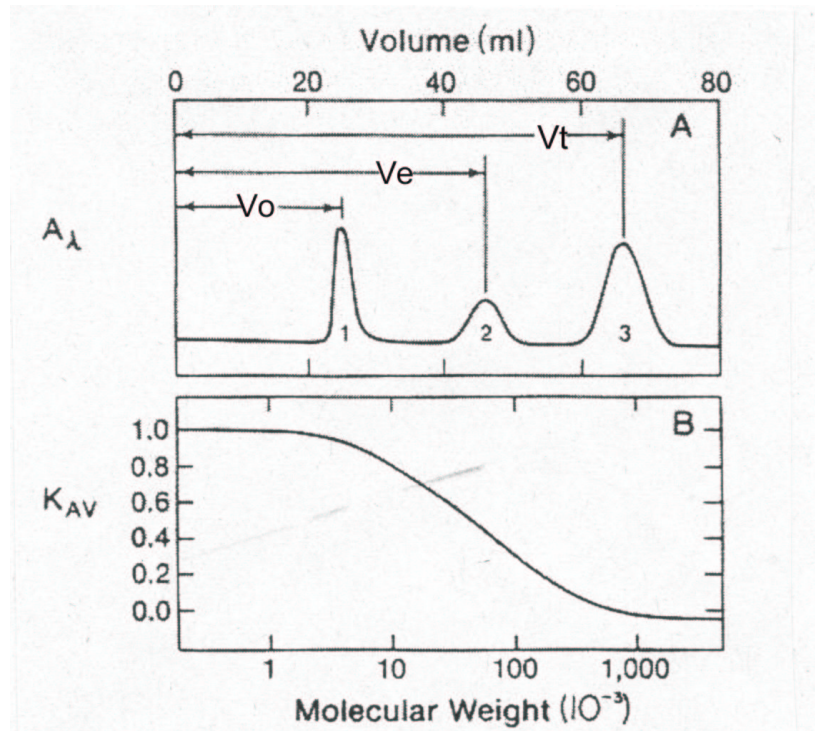


Abb. 9: Chromatographische Leistung einer Größenausschluß-Matrix

- A** beschreibt ein einfaches Elutionsprofil. Komponente 1 ist vollständig aus der Matrix ausgeschlossen (V_0), Komponente 2 teilweise (V_e) und Komponente 3 nicht (V_t).
- B** beschreibt die sigmoide Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten K_{av} vom Logarithmus des Molekulargewichts.

Das Trennverfahren einer Gelfiltrationssäule ist auf maximal 10 Proteine begrenzt und ermöglicht daher nur moderate Anreicherungsfaktoren. Zumeist wird Gelfiltration deshalb zu einem relativ späten Zeitpunkt innerhalb einer Anreicherung eingesetzt, an dem die Anzahl der verbliebenen Kontaminationen bereits gering ist.

b) Elektrophoretische Methoden

Elektrophoretische Methoden ermöglichen die hochauflösende Auftrennung von Proteinen primär im analytischen Bereich. Insbesondere die SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese ist für die Reinheitskontrolle von Präparationen im Verlauf einer Proteinaufreinigung prädestiniert und wird dafür routinemäßig eingesetzt.

Das elektrophoretische Prinzip:

Ein Proteinmolekül besitzt in wässriger Lösung bei jedem pH-Wert, der nicht dem isoelektrischen Punkt entspricht, eine bestimmte Nettoladung. Diese bewirkt im elektrischen Feld eine Bewegung des Proteinmoleküls. Die spezifische Mobilität v ist dabei proportional der Anzahl der Nettoladungen pro Molekül z und umgekehrt proportional der Viskosität des Mediums η sowie des Partikelradius r (Stokes Radius):

$$v = z / 6\pi\eta r$$

Die Auftrennung von Proteinen bei der Elektrophorese in freier Lösung erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung und ihrer unterschiedlichen Größe und wird durch Diffusion und intermolekulare elektrostatische Wechselwirkungen verschlech-

tert. Die Diffusion wird durch möglichst niedrige Arbeitstemperaturen minimiert, die elektrostatischen Wechselwirkungen durch hohe Ionenstärke oder ein anionisches Detergens. Da eine Erhöhung der Ionenstärke auch eine Erhöhung der Stromstärke während der Elektrophorese bewirkt ist für ausreichende Wärmeabführung Sorge zu tragen. Zusätzlich werden als Elektrolyte Puffer eingesetzt, bei denen die Ionen eine hohe Molekülgröße und damit eine geringe Mobilität und Leitfähigkeit haben (z.B. HTris⁺). Elektrophoresen werden meist bei neutralen oder schwach alkalischem pH-Wert durchgeführt, bei denen die meisten Proteine zur Anode wandern.

Der Elektrophorese in freier Lösung bezüglich Trennleistung weit überlegene Technik ist die **Gelelektrophorese**. Hier findet die Elektrophorese innerhalb einer netzartigen Matrix statt, welche Poren unterschiedlichen Durchmessers aufweist. Diese Poren führen in Abhängigkeit der Molekülgröße zu unterschiedlichen effektiven Viskositäten des Mediums. Gelelektrophorese trennt daher sowohl auf der Basis der Ladung als auch der Größe; das Gel kann über den Vernetzungsgrad für ein bestimmtes Trennproblem (einen aufzutrennenden Größenbereich) optimiert werden. Ein Hauptvorteil von Gelsystemen liegt in der Minimierung von Konvektion und Diffusion von Proteinen, was sich in der hohen Bandenschärfe während des gesamten Elektrophoreseprozesses zeigt.

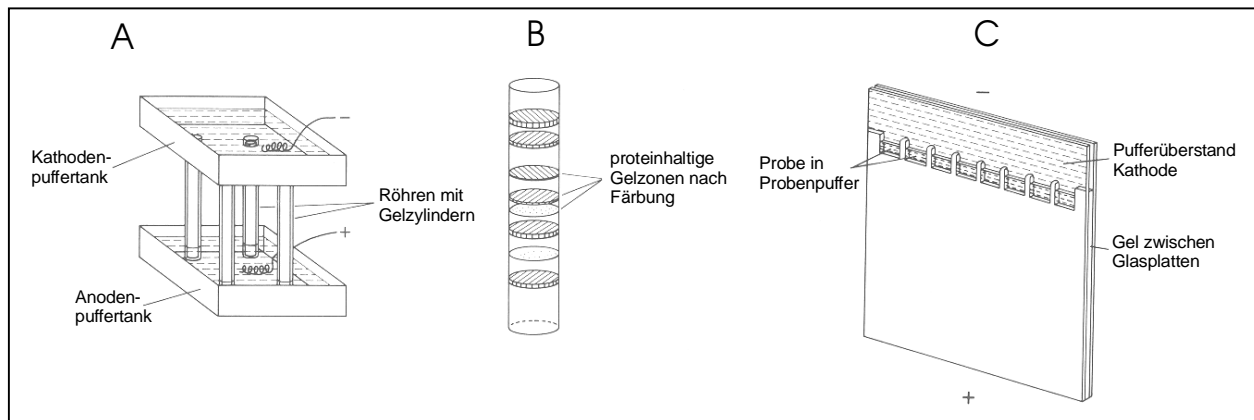


Abb. 10: (A) Versuchsaufbau zur Disk-Gelelektrophorese; (B) Lokalisierung von getrennten Proteinen in Disk-Gelen; (C) Aufbau eines Slab-Gels

Die frühen Stärke-Gele wichen in den 60er Jahren (1964) synthetischen Polyacrylamidgelen, deren Eigenschaften kontrollierbarer und reproduzierbarer waren. Als günstigste Gelform entwickelte sich die thin-slab-Form (Abb. 10C), die im Gegensatz zur lang benutzten Disk-Form (Abb. 10A,B) die Aufgabe mehrerer Proben ermöglicht, gleichzeitig durch die hohe Oberfläche eine bessere Wärmeabführung ermöglicht.

Einfache (Native) Gelelektrophorese:

Die Proteine werden hier in ihrer aktiven unveränderten (nativen) Form aufgetrennt. Proben- und Laufpuffer enthalten weder SDS noch Harnstoff. Die Auftrennung erfolgt nach Größe und Ladung. Die meisten Proteine sind in dem verwendeten schwach alkalischen Laufpuffer (pH 8-9) negativ geladen und wandern zur Anode. Alle unter diesen Bedingungen positiv geladenen Proteine gelangen nicht in das Gel sondern diffundieren in den Kathodenpuffer.

Die native Gelelektrophorese bietet die Grundlage für einen Aktivitätsnachweis von Proteinen auf dem Gel.

SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Bei dieser populärsten aller gelelektrophoretischen Methoden werden die Enzyme vor der Auftrennung mit Hilfe des Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert. Die Zugabe von 2-Mercaptoethanol dient der Spaltung vorhandener Disulfid-Brückenbindungen.

Gegenüber der nativen Gelelektrophorese bietet sie zwei Vorteile:

- die Auftrennung ist hier ausschließlich von der Größe des Proteins abhängig, sehr hohe Auflösung ($\geq 1\%$ of MW)
- Aggregate und unlösliche Partikel werden gelöst, in die einzelnen Proteine überführt und sind anschließend auftrennbar

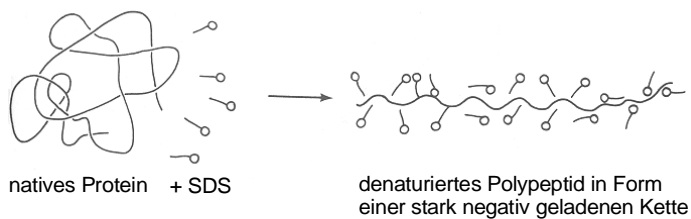


Abb. 11: Die denaturierende Wirkung von SDS

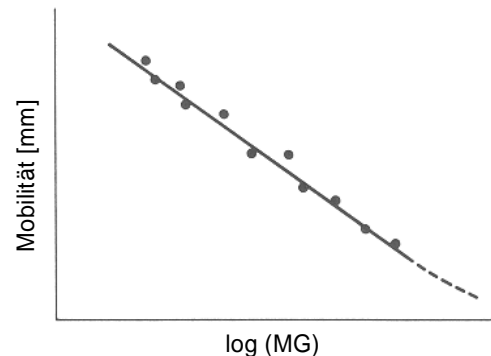


Abb. 12: Auftragung der Mobilität gegen das Molekulargewicht für eine Reihe von Proteinen (Größenstandards)

SDS bindet stark an Proteine. Die resultierenden Polypeptidketten enthalten 1 Molekül SDS auf jeweils 2 Aminosäurereste. Oligomere, bei denen die Polypeptide nicht kovalent miteinander verbunden sind, werden in die individuellen Untereinheiten gespalten. Jedes SDS-Molekül besitzt eine negative Ladung, für ein typisches Polypeptid der Masse 40000 ergeben sich so 180 negative Ladungen. Dies übersteigt die Zahl der Nettoladungen des Proteins bei neutralem pH bei weitem. Entsprechend ist das Ladungs-Größen-Verhältnis für alle Proteine praktisch das gleiche und die Auftrennung ist ausschließlich ein Resultat des Molekularsieb-Effekts der Gelporen.

Trotz der Tatsache daß SDS-PAGE keine Auftrennung von Proteinen identischer Größe ermöglicht, bietet es als einfache Standardmethode doch die höchste Auflösung. Durch gleichzeitiges Auftragen von Größenstandards kann das gesamte Gel kalibriert werden. Die graphische einfach-logarithmische Auftragung der Mobilität von Proteinen gegen ihr Molekulargewicht liefert innerhalb eines gewissen Bereiches eine lineare Abhängigkeit.

Der Vernetzungsgrad des Polyacrylamid Gels und damit seine Porengröße kann über einen weiten Bereich der Größe der aufzutrennenden Proteine angepaßt werden. Zwei Variationen sind möglich :

- Veränderung des Acrylamid-Gehalts (3-20%)
- Veränderung des Quervernetzer-Gehalts Bisacrylamid (0,1-1%)

Sehr große Proteine (≤ 1000 kDa) werden mit niedrig konzentrierten (3-4% Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid) Gelen getrennt, sehr kleine Proteine (≥ 10 kDa) benötigen stark vernetzte Gele (20% Acrylamid, 1% Bisacrylamid). Standardmäßig werden 12%ige Gele eingesetzt.

Isoelektrische Fokussierung:

Bei der IEF befindet sich zwischen Kathode und Anode eine wässrige Lösung verschiedener Ampholyte. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes bilden diese einen linearen pH-Gradienten aus. Ampholyte sind hochkomplexe Mischungen (mehrere hundert bis tausend) sehr kleiner Proteine, von denen jedes seinen individuellen pI aufweist und bei Anlegen eines elektrischen Feldes aufbaut. Der „lineare“ pH-Gradient beruht also in Wirklichkeit auf der Ausbildung einer Vielzahl diskreter pH-Werte, die den angegebenen Bereich relativ gleichmäßig abdecken. Zugegebene Proteine wandern in diesem Feld bis zu der Stelle, an der der vorherrschende pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Die neutrale Gesamtladung verhindert eine weitere Wanderung, durch besonders hohe Felder wird zusätzlich ein Fokuseffekt erreicht. Das verwendete Gel hat hier lediglich die Aufgabe den pH-Gradienten zu stabilisieren. Proteine sollen nicht durch Molekularsieb-Effekte in ihrer Bewegung beeinträchtigt werden, die verwendeten Gelkonzentrationen sind daher möglichst niedrig. Bei der IEF bedient man sich für gewöhnlich säulenförmiger Gele. Ein Vorteil der IEF ist ihre hohe Auflösung was im Terminus Fokussierung bereits hervorgeht. Die meisten anderen Proteintrennungsmethoden gehen mit Diffusion und Mischungsphänomenen einher, welche mit zunehmender Zeit negative Auswirkungen zeigen. Bei der IEF spielt Diffusion keine Rolle mehr. Bewegt sich ein Proteinmolekül aus den Bereich seines isoelektrischen Punktes wird es geladen und wandert sofort zurück. Ist die IEF beendet befindet sich das System im Gleichgewicht und es findet (bei angelegtem Feld!) theoretisch keinerlei Bewegung mehr statt. Aufgrund der Abwesenheit leitender Ionen fließt nahezu kein Strom und die dadurch möglichen hohen Spannungen bewirken eine zusätzliche Bandenschärfe.

Bestimmte Phänomene können die Anwendung der IEF einschränken:

- das Protein ist bei seinem isoelektrischen Punkt nicht stabil (z.B. Zerfall in Untereinheiten)
- das Protein ist bei seinem isoelektrischen Punkt nicht hinreichend löslich
- das Protein bildet mit den Ampholyten Komplexe (was sich in der Ausbildung mehrerer Banden bemerkbar machen kann)

Die IEF ist die 1. Stufe bei der höchstauflösenden 2D-Gelelektrophorese, bei der durch Kombination mit SDS-PAGE als 2. Stufe die Auftrennung selbst komplexester Proteingemische gelingt.

Färbung und Detektion von Proteinen nach Gelelektrophoresen:

Nach Gelelektrophorese müssen proteinhaltige Zonen sichtbar gemacht werden, was i.d.R. mit Hilfe eines organischen Farbstoffes geschieht, welcher fest an Proteine bindet. Die Wahl des Farbstoffes richtet sich nach:

- seiner Nachweisempfindlichkeit
- seiner Fähigkeit alle Typen von Proteinen gleichmäßig zu färben

Bekannte Farbstoffe sind Coomassie Blau R-250, Coomassie Blau G250, Amido Schwarz, Nigrosin.

Die Färbung mit org. Farbstoffen beinhaltet folgende Schritte:

- unmittelbar nach elektrophoretischer Trennung werden die Proteine durch Denaturierung fixiert (da es ansonsten zu einer Diffusion der Banden käme).
gebräuchlich: Methanol/Essigsäure/Wasser im Verhältnis 3:1:6.
- Gel wird in Farbstofflösung bis zur völligen Durchtränkung inkubiert.
- überschüssiger, nicht gebundener Farbstoff wird durch Schwenken in Entfärbelösung entfernt.

Eine gegenüber Coomassie Blau um den Faktor 10-20 empfindlichere Färbemethode ist die Silver-Stain-Methode. Die Behandlung des Gels mit Silbernitrat bewirkt

nichtstöchiometrische Bindung von Silber an Proteine. Diese Komplexe werden nach Reduktion als schwarze bis braune Banden sichtbar. Durch die hohe Empfindlichkeit minimiert sich die notwendige Probemenge und Überladungseffekte werden vermieden. Nachteil ist, daß sich Proteine gegenüber Silver-Stain in ihrem Färbeverhalten sehr unterschiedlich verhalten können.

Die spezifische Detektion eines Proteins auf dem Gel gelingt mit Hilfe eines geeigneten Aktivitätstests (nur bei nativen Gelen) oder mit Hilfe entsprechender monoklonaler Antikörper.

VII. Vertiefende Literatur:

Protein Purification. 1994. Robert K. Scopes. 3th edition. Springer-Verlag, New York

Methods in Enzymology. Vol. 182. Guide to protein purification. 1990. ed: Murray P. Deutscher. Academic Press San Diego