

2 Gelelektrophoresen

(Ute Dechert)

Die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld wird zur Trennung komplexer Gemische von Biomolekülen ausgenutzt. Die Trennmethode wird unter dem Begriff Elektrophorese zusammengefasst. Da die meisten Biomoleküle Ladungen tragen, gehören Elektrophoresen zu den wichtigsten analytischen Methoden. Für die Untersuchung und Charakterisierung komplexer Mischungen sowie zur Überprüfung ihrer Einheitlichkeit sind sie unentbehrlich. Die wesentlichen Unterschiede in den Trennungsmethoden ergeben sich aus dem für jedes Biomolekül charakteristischen Verhältnis von Ladung zu Masse bzw. aus ihrer Molekülgröße und -form.

Bei den Elektrophoresen unterscheidet man trägerfreie und trägergebundene Systeme. Dieses Kapitel behandelt nur trägergebundene Systeme, sog. Gelelektrophoresen. Hier erfolgt die Separierung der einzelnen Substanzen nicht nur durch ihre Ladung, sondern zusätzlich durch einen Siebeffekt des Gels (Trägermaterials) aufgrund von Größe und Gestalt der zu trennenden Moleküle. Für die meisten Trennprobleme wird Celluloseacetat, Stärke, Agarose oder Polyacrylamid als Träger verwendet.

Die elektrophoretische Beweglichkeit von geladenen Teilchen hängt ab von

- der Gesamt-Nettoladung des Moleküls
- der Größe und Gestalt des Moleküls
- der Porengröße des Trägers
- pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Puffers
- der elektrischen Feldstärke.

Gelelektrophoresen können kontinuierlich oder diskontinuierlich durchgeführt werden. Beim letzteren Verfahren, kurz Disk-Elektrophorese, ist das Trägermaterial in Bezug auf die Gelzusammensetzung diskontinuierlich aufgebaut. Es erfolgt so eine Konzentrierung der Probe zu einer sehr schmalen Startbande.

Nachfolgend werden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen für Proteine (Abschn. 2.1), Nachweismethoden für Proteine (Abschn. 2.2), Gelelektrophoresen für Nucleinsäuren (Abschn. 2.3), die Anfärbung von Nucleinsäuren in Gelen (Abschn. 2.4) und die Elution von Nucleinsäuren aus Gelen (Abschn. 2.5) behandelt.

Unabhängig von der verwendeten Gelelektrophorese erfolgt eine Größenanalyse/Quantifizierung der aufgetrennten Makromoleküle durch Vergleich mit im Gel aufgetragenen Standardproteinen bzw. Standard-DNA-Molekülen bekannter Menge/Größe. Diese Marker sind von verschiedenen Herstellern zu beziehen und sollten immer mitgeführt werden.

Literatur

Cooper, T.G. (1981): Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin.
Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.) (1998): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Das grundlegende Prinzip aller elektrophoretischen Trenntechniken für Proteine ist deren Wanderung in einem elektrischen Feld. Physikalische Effekte wie Konvektion und Diffusion werden durch die Ver-

wendung von polymeren Matrices umgangen. Polyacrylamid als Trägermaterial für die Gelelektrophorese besitzt das höchste Auflösungsvermögen. Dies gilt nicht nur für DNA-Fragmente, sondern auch für Proteine, zu deren Analyse es heute nahezu ausschließlich verwendet wird. Lediglich Proteine mit einem Molekulargewicht über 500 kDa, z.B. Immunglobuline, werden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Das dreidimensionale Netzwerk des Polyacrylamids wird durch die radikalische Polymerisation des monomeren Acrylamids und eines quervernetzenden bifunktionellen Reagenzes aufgebaut. Meist kommt dafür N,N'-Methylenbisacrylsäureamid zum Einsatz.

Die Porengröße ist in einem weiten Bereich variabel. Die Acrylamidkonzentration kann zwischen 2 % und 30 % (w/v) variieren. Im Netzwerk des Polyacrylamids werden große Moleküle stärker retardiert als kleine (größenabhängige Trennung). Bei niedrigen Acrylamidkonzentrationen ist der molekulare Siebeffekt gering. So überwiegt eine Trennung aufgrund des Verhältnisses von Masse zu Ladung.

Techniken, die sich die Ladung des Polypeptids für eine Trennung zunutze machen, finden nur bei der isoelektrischen Fokussierung Anwendung (Abschn. 2.1.6). Durch extreme pH-Werte in den kathodischen bzw. anodischen Pufferreservoirs sowie einen pH-Gradienten innerhalb der Gelmatrix wandern die sauren und basischen Proteine nicht aus dem Gel heraus. Die Proteine bewegen sich innerhalb des Gels bei einer variablen Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von ihrem eigentlichen Verhältnis von Ladung zu Masse. Die Ladung des Proteins vermindert sich während des Laufes, da das Molekül Zonen erreicht, in denen sich der pH-Wert im Gel dem pI-Wert des Proteins annähert. Am isoelektrischen Punkt pI ist die Nettoladung null, da das Polypeptid bei diesem Wert gleich viele negative und positive Ladungen aufweist. Diese Methoden trennen die Proteine unter nativen Bedingungen. Das kann eventuell Aufschluß über eine spezifische, elektrophoretisch getrennte Komponente mit biologischer Aktivität geben.

Bei der denaturierenden isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine in einem speziellen Pufferpuffer denaturiert und in einem harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel getrennt. Hierdurch werden die Seitenketten der Aminosäuren, die zum pI-Wert eines Proteins beisteuern, maximal exponiert. Proteine, deren pI-Wert oberhalb des pH-Wertes des Gels liegt, können im Kathodenpuffer verloren gehen und somit nicht getrennt werden. Dies wird durch einen Zusatz von geladenen Substanzen, wie z.B. SDS (Natriumdodecylsulfat), behoben. Durch dieses Detergenz werden die Proteine solubilisiert und denaturiert. Unabhängig vom ursprünglichen sauren oder basischen pI-Wert des Polypeptides wird eine negative Gesamtladung eingeführt. So besitzt das Polypeptid ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse. Dadurch hängt die elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels ab.

Für Proteine gibt es keine allgemeine Wanderungsrichtung, da sie nicht negativ geladen sind wie z.B. DNA-Moleküle. Durch Zusatz des negativ geladenen Detergenz SDS erhalten alle Proteine die gleiche negative Ladung. Die Wanderungsrichtung ist dann zur Anode hin.

Die Porengröße eines Gels wird durch das Verhältnis der Konzentrationen von Acrylamidmonomer und Quervernetzungsreagenz bestimmt. Häufig entspricht die Angabe einfach dem Gehalt an Acrylamid in Gewichtsprozent. Die Gele enthalten zwischen 3 % und 30 % (w/v) Acrylamid, was etwa einer Porengröße zwischen 0,5 und 0,2 nm Durchmesser entspricht. Niederprozentige Acrylamidgele haben also weite Poren und setzen der Wanderung großer Moleküle wenig Widerstand entgegen. Durch kontinuierliche Veränderung der Acrylamidkonzentration in der Polymerisationslösung erhält man so genannte Porengradientengele. Sie dienen z.B. zur Ermittlung der Moleküldurchmesser von nativen Proteinen oder zur Auftrennung von komplexen Proteingemischen mit großen Molekulargewichtsbereichen.

Liegen die elektrophoretischen Beweglichkeiten der Proteine in einem engen Bereich, so kann durch Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme in Kathodenpuffer und Gelpuffer vor der eigentlichen Trennung im Trenngel eine Konzentrierung im Sammelgel erfolgen. Man erzielt eine scharfe Bande nahezu unabhängig vom Volumen der aufgetragenen Probe. Diese Technik wird als diskontinuierliche Gelelektrophorese bezeichnet. Die Diskontinuität bezieht sich auf vier Parameter: Gelstruktur, pH-Wert und Ionenstärke der Puffer sowie Art der Ionen im Gel- und Elektrodenpuffer.

Bei der sich durch Anwendungsbreite und Einfachheit auszeichnenden kontinuierlichen Gelelektrophorese wird sowohl bei der Herstellung des Gels als auch bei der Elektrophorese der gleiche Puffer

verwendet. Dadurch sind nicht zwei unterschiedliche Gele (Sammel- und Trenngel) erforderlich. Zudem werden bei der kontinuierlichen Gelelektrophorese weniger Artefakte beobachtet. Das trifft insbesondere für Proteine zu, die zuvor quervernetzt wurden. Im Vergleich zur diskontinuierlichen Gelelektrophorese kann jedoch keine vergleichbar hohe Auflösung der Proteinbanden erzielt werden.



Trouble Shooting

Die folgenden Punkte gelten für alle Protein-Gelelektrophoresen. Spezielle Probleme sind bei den einzelnen Elektrophoresen aufgeführt.



Materialien

- Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) sollte stets frisch angesetzt werden. Mit einer alten Lösung tritt eventuell keine oder nur eine verzögerte Polymerisation ein.
- Acrylamidstammlösungen sollten nach der Zubereitung lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt werden, um eine Polymerisation zu vermeiden. Acrylamidlösungen hydrolysieren langsam unter Bildung von Acrylsäure und Ammoniak und sollten somit nicht länger als 30 Tage aufbewahrt werden.
- Da es sich bei dem Acrylamidmonomer um ein starkes Neurotoxin handelt, müssen bei der Herstellung von Stamm- wie auch Arbeitslösungen entsprechende Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden. Es sollte ganz auf den Umgang mit festem Acrylamid verzichtet und auf handelsübliche fertige Stammlösungen zurückgegriffen werden.
- Die Lösungen zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel sowie eventuell die SDS-Lösung sollten vor der Zugabe der Reaktionsstarter (APS, TEMED) im Wasserstrahlvakuum vorsichtig entgast werden. Zuviel gelöster Luftsauerstoff verzögert ebenfalls eine Polymerisierung.
- Auch bei SDS sollte auf handelsübliche, fertige 10 %ige Stammlösungen zurückgegriffen werden, da es sich bei festem, feinpulvrigem SDS um eine gesundheitsschädliche Substanz handelt.
- Bei der Herstellung von Stamm- und Arbeitslösungen sollten entsprechende Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.



Durchführung

- Das Gel polymerisiert nicht: Bei der Gelzubereitung wurde TEMED oder APS weggelassen; die verwendete APS-Lösung war zu alt (neu angesetzte APS-Lösung verwenden; eventuell APS-Konzentration erhöhen); die Lösungen für die Gelzubereitung enthalten zuviel gelösten Sauerstoff (s.o., länger entgasen, besonders wenn kalte Lösungen verwendet wurden).
- Das Gel polymerisiert zu schnell oder es reißt während der Polymerisation (meist bei Gelen mit hoher Acrylamidkonzentration): APS-Menge verringern oder kalte Lösungen für die Gelzubereitung verwenden.
- Das Gel löst sich von den Platten: In der Regel wurden die Glasplatten nicht ausreichend gesäubert.
- Die Proteine wandern nicht in das Sammelgel ein: Die Polarität der Elektroden wurde verwechselt oder das Gelsystem ist für die Proteine ungeeignet.
- Die Proteinbanden sind diffus: Die Probe enthält zuviel Salz oder der Trenngelpuffer bzw. das Trenngel wurden falsch angesetzt.
- Gleiche Proteinbanden treten in allen Spuren auf, auch in solchen, die nicht mit Probenmaterial beladen wurden: Proben- und/oder Elektrodenpuffer sind kontaminiert.
- *Smiling*-Effekt: Proteinproben in den äußeren Gelspuren wandern langsamer als Proben in der Mitte des Gels. Dies wird von einer ungleichmäßigen Erwärmung des Gels verursacht und kann z.B. durch eine erhöhte Wärmeableitung verhindert werden, indem die untere Pufferkammer vollständig mit Laufpuffer gefüllt wird (je nach verwendetem Apparatesystem), die Elektrophorese zwischen 10 °C und 20 °C betrieben bzw. der untere Puffer mittels Magnetrührer gerührt wird. Des Weiteren kann die Wärmeentwicklung durch eine Elektrophorese bei verminderter Stromstärke reduziert werden.
- Proteinbanden zeigen vertikale Streifen: Probenmenge reduzieren oder die Elektrophorese bei geringerer Stromstärke (ca. 25 %) durchführen. Die Streifen können auch durch präzipitiertes Protein verursacht werden, das durch Zentrifugation der Proben vor dem Auftrag entfernt werden kann.

- Das Tragen von Handschuhen ist besonders empfehlenswert, wenn geringe Proteinmengen mittels Silberfärbung nachgewiesen werden sollen. Durch Keratine können artifizielle Proteinspots (pH-Bereich 5–8, Molekulargewichtsbereich 50–65 kDa) hervorgerufen werden.

Literatur

- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W., Wingfield, P.T. (Hrsg.) (1995, 1996): Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, New York.
- Hames, B.D., Rickwood, D. (Hrsg.) (1990): Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. IRL Press at OUP, Oxford.
- Kellner, R., Lottspeich, F., Meyer, H.E. (Hrsg.) (1999): Microcharacterization of Proteins. VCH, Weinheim.

2.1.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Bei der eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) werden die Proteine in Gegenwart von 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgrund ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode getrennt. Die Polypeptide werden bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert. Durch den Zusatz des anionischen Detergenz wird die Eigenladung der Proteine so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein). Niedermolekulare Thiole wie β -Mercaptoethanol (β -ME) oder Dithiothreitol (DTT) im Probenpuffer bewirken eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten. Häufig schützt man diese reduzierten SH-Gruppen noch durch eine darauffolgende Alkylierung mit Iodacetamid oder Iodessigsäure.

Diese Elektrophorese eignet sich zur Ermittlung der molekularen Masse von Proteinen, da sich bei der Trennung im restriktiven Polyacrylamidgel eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes und der relativen Wanderungsstrecke einer SDS-Polypeptid-Mizelle ergibt.

Mithilfe von Markerproteinen lassen sich über eine Eichkurve die Molekulargewichte der Proteine ermitteln. Bei der Überprüfung der Proteine auf Einheitlichkeit muss beachtet werden, dass Oligomere durch die Denaturierungsbedingungen in ihre konstituierenden Polypeptidketten getrennt werden. Da diese Polypeptidketten unterschiedliche molekulare Massen aufweisen können, sind Verunreinigungen der Proteine in solchen Fällen nur vorgetäuscht.

Im diskontinuierlichen System passiert die Probe zunächst ein Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Der Sammelgelpuffer enthält Chloridionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit größer ist als die der Proteinprobe. Der Elektrophoresepuffer hingegen enthält Glycinionen, deren elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit geringer ist. Die Proteine „stapeln“ sich entsprechend ihrer Geschwindigkeit im Feldstärkegradienten zwischen Ionen mit einer niedrigen (Glycinionen) und einer hohen Mobilität (Chloridionen). Dieses Nettoresultat wird als *stacking*-Effekt bezeichnet. Somit wird eine Vortrennung und Aufkonzentrierung erreicht, was sich in einer scharfen Proteinbande äußert. Das Trenngel besitzt eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel. Beim Einwandern der Proben in das Trenngel tritt eine weitere Verschärfung der Zone ein. Die großen Proteine werden an dieser „Gelgrenze“ zunächst zurückgehalten, sodass die Glycinionen passieren können. Im Puffersystem des Trenngels löst sich dann der Proteinstapel auf und die Proteine werden aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt.

Diverse Hersteller (z.B. Bio-Rad, Invitrogen GmbH) bieten bereits fertige (*pre-cast*) Minigele zur Vertikal-Gelelektrophorese an. Neben Tris-HCl-Systemen finden Bis-Tris-, Tris-Acetat-, Tris-Glycin- wie auch Tricine-Puffersysteme eine verstärkte Anwendung. Neben *pre-cast* Gelsystemen mit einer einheitlichen Polyacrylamidkonzentration im Trenngel (z.B. 6, 8, 10, 12 und 18 %), stehen z.B. lineare Gradientengele zur Verfügung, die Bereiche von 3–8 %, 4–12 % oder 10–20 % Polyacrylamid abdecken. Diese große Systemvielfalt ermöglicht somit die Wahl eines spezifischen Lösungsansatzes für das jeweilige Analysepro-

blem. Trotz begrenzter Haltbarkeit (einige Wochen bis zu einem Jahr) und vergleichsweise hohen Kosten (ca. 18 € pro Gel) zeigen diese Fertiggele eindeutige Vorteile hinsichtlich Zeitaufwand und Reproduzierbarkeit, insbesondere bei einem hohen Durchsatz an zu analysierenden Proben.

Das folgende Protokoll gilt für vertikale Plattengele.



Materialien

Für alle folgenden Protokolle sollte Milli-Q-gereinigtes Wasser (Milli-Q-H₂O oder äquivalente Qualität) verwendet werden. 15 ml Trenngel bzw. 5 ml Sammelgel sind ausreichend für Geldimensionen von 0,75 mm × 16 cm × 16 cm (Vertikal-Gelelektrophoreseapparatur: Protean II 16 cm, Bio-Rad; SE 400 Vertical Unit oder SE 600 Ruby, GE Healthcare); für dickere Gele und für Minigele müssen die Volumina und die angelegten Stromstärken entsprechend angepasst werden (bei gleicher Spannung fließt bei dickeren Gelen nach dem Ohmschen Gesetz weniger Strom $V = I \times R$); Minigele (z.B. Mini-Protean II, Bio-Rad; SE 250/260, GE Healthcare) werden vermehrt eingesetzt, da hierbei eine Kombination von Geschwindigkeit der Trennung und hohem Auflösungsvermögen auftritt; die in Tab. 2–1 in Klammern angegebenen Mengen sind für Minigele der Dimension 0,75 mm × 7,3 cm × 8,3 cm berechnet.

- 30 % (w/v) Acrylamid: 30 g Acrylamid, 0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid (2 × crystallized Grade) ad 100 ml H₂O
- Trenngelpuffer: 1 M Tris-HCl, pH 8,8
- Sammelgelpuffer: 1 M Tris-HCl, pH 6,8
- 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS): 0,2 g APS ad 2 ml H₂O
- 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS): 10 g SDS ad 100 ml H₂O
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)
- 10 × Elektrodenpuffer: 144 g Glycin, 30 g Tris-Base, 10 g SDS ad 1 l H₂O; ergibt nach dem Auffüllen mit Wasser pH 8,9
- Bromphenolblau: gesättigt, in 0,1 % Ethanol
- Isopropanol
- optional: Ethanol
- 3 × Probenaufragspuffer: 1,75 ml Sammelgelpuffer, 1,5 ml Glycerin, 5 ml 10 % (w/v) SDS, 0,5 ml β-Mercaptoethanol, 1,25 ml Bromphenolblau
- Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur mit Glasplatten, Abstandhaltern sowie Taschenschablonen
- Stromgeber

In Tab. 2–1 ist die Zusammensetzung des Sammelgels sowie von Trenngelen mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration aufgeführt. Mit diesen Gelen wird ein großer Trennbereich (12–200 kDa) abgedeckt; für spezielle Auflösungen kann die optimale Gelkonzentration ausgewählt werden. Anhaltspunkte für die Trennbereiche der Gele sind Tab. 2–2 zu entnehmen.

Tab. 2–1: Zusammensetzung von Gelen unterschiedlicher Acrylamidkonzentration für die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese. Die in Klammern angegebenen Mengen sind für Minigele der Dimension 0,75 mm × 7,3 cm × 8,3 cm berechnet

Gelzusammensetzung	Acrylamidkonzentration				
	Sammelgel 5%	Trenngel 7,5%	10%	12,5%	15%
30% Acrylamid [ml]	0,833 (0,333)	3,750 (1,250)	5,000 (1,667)	6,250 (2,083)	7,500 (2,500)
Trenngelpuffer [ml]	0,625 (0,250)	5,625 (1,875)	5,625 (1,875)	5,625 (1,875)	5,625 (1,875)
H ₂ O [ml]	3,462 (1,385)	5,343 (1,781)	4,093 (1,364)	2,843 (0,948)	1,593 (0,531)
10% SDS [μl]	50 (20)	150 (50)	150 (50)	150 (50)	150 (50)
10% APS [μl]	25 (10)	120 (40)	120 (40)	120 (40)	120 (40)
TEMED [μl]	5 (2)	12 (4)	12 (4)	12 (4)	12 (4)

Tab. 2–2: Trennbereiche von Polyacrylamidgelen für SDS-denaturierte Proteine

Acrylamid-konzentration [%]	Molekularmasse [kDa]
5	60 – 200
10	16 – 70
15	12 – 45



Durchführung

Herstellung des Polyacrylamidgels

- Zwei Glasplatten gründlich reinigen, mit Wasser spülen und die dem Gel zugewandten Plattenseiten mit einem in Ethanol getränkten, fusselfreien, weichen Tuch (Kimwipe o.ä.) entfetten
- gemäß den Angaben des Herstellers der Elektrophoreseapparatur die Glasplatten mit den 0,75 mm-Abstandhaltern zu einem Sandwich zusammenbauen und in die vorgesehene Halterung zum Gießen des Gels einklemmen
- Dichtigkeit der Gelkassette durch Einfüllen von Wasser überprüfen; anschließend das Wasser wieder vollständig aus der Kammer entfernen (letzte Tropfen lassen sich mithilfe von Filterpapieren entfernen)
- Taschenschablone in die Gelkassette einsetzen und auf der vorderen Glasplatte den unteren Rand der Probestaschen mit einem Filzschreiber markieren, anschließend die Schablone wieder entfernen
- für das Trenngel Gellösung vorbereiten (Tab. 2–1); hierfür Acrylamidlösung, Trenngelpuffer sowie Wasser in einem 25 ml-Erlenmeyerkolben mit Vakuumausgang zusammengeben und unter Rühren vorsichtig im Wasserstrahlvakuum entgasen; dann SDS, APS sowie TEMED zugeben und die Lösung vorsichtig mischen
- Trenngellösung mit einer Pasteur-Pipette luftblasenfrei in die Gelkassette einfüllen, sodass die Höhe der Lösung zwischen den Glasplatten ca. 1–2 cm unterhalb der Probestaschenmarkierung liegt
- Trenngellösung vorsichtig mit Wasser oder Isopropanol überschichten (ca. 1 cm dick), damit sich eine flache Grenzfläche während der Polymerisation ausbilden kann
- Trenngellösung bei Raumtemperatur 30–60 min polymerisieren lassen; die Grenzschicht zwischen dem Gel und der überschichteten Lösung muss deutlich sichtbar sein
- über dem Gel stehende Flüssigkeit abgießen, mit Wasser ausspülen und Flüssigkeitsreste mittels Filterpapier entfernen
- das fertige Trenngel kann kurzfristig gelagert werden (4 °C); hierbei sollte es mit dem im Gel verwendeten Puffer überschichtet werden; das Sammelgel sollte jeweils kurz vor Durchführung der Elektrophorese erstellt werden, da ansonsten eine graduelle, durch Diffusion verursachte Vermischung der Puffer zwischen den beiden Gelen zu beobachten ist; die Auflösung wird beeinträchtigt
- Sammelgellösung gemäß Tab. 2–1 zubereiten, dabei, wie bereits für die Trenngellösung beschrieben, SDS, APS und TEMED erst nach Entgasen zugeben
- Sammelgellösung mit einer Pasteur-Pipette bis zum oberen Rand der Gelkassette einfüllen und sofort die Schablone für die Probestaschen einsetzen; wenn nötig noch Sammelgellösung nachfüllen, damit die Freiräume vollständig ausgefüllt werden; beim Gießen des Sammelgels Luftblasenbildung an den unteren Enden der Probestaschen vermeiden, da diese nach der Polymerisierung kleine, zirkuläre Depressionen in den Taschen verursachen und während der Trennung Verzerrungen in den Proteinbanden entstehen
- Sammelgellösung bei Raumtemperatur 30–45 min polymerisieren lassen; eine optische Diskontinuität um die Probestaschen herum wird nach erfolgter Polymerisierung deutlich sichtbar.

Probenvorbereitung

- 3 Teile zu analysierende Proteinlösung mit 1 Teil 3 × Probenauftragspuffer mischen und sofort 3–5 min bei 100 °C hitzedenaturieren; die denaturierten Proben können bei –20 °C aufbewahrt werden
- sobald die Proben mit 3 × Probenauftragspuffer versetzt wurden, sollte vermieden werden, sie ohne Hitzedenaturierung bei Raumtemperatur aufzubewahren, da z.B. endogene Proteasen, die in SDS-Puffer sehr aktiv sein können, schwerwiegende Degradationen hervorrufen können
- handelt es sich bei den Proben um Lyophilisate, die Sedimente in 50–100 µl Probenauftragspuffer resuspendieren und 3–5 min bei 100 °C denaturieren
- die Proben dürfen keine Kaliumionen enthalten, da diese ein unlösliches Salz mit Dodecylsulfat bilden
- um eine möglichst große Auflösung zu erzielen, sollten die Proteinproben vor der Denaturierung bei 0 °C gekühlt werden
- für eine komplexe Proteinmischung wird empfohlen, 25–50 µg Gesamtprotein in weniger als 20 µl aufzutragen, wenn sich eine Färbung des Gels mit Coomassie Blau anschließt (Abschn. 2.2.1); von Proben, die nur ein oder wenige Proteine enthalten, sollten 1–10 µg Gesamtprotein aufgetragen werden; bei einer anschließenden Silberfärbung kann je nach Komplexität der Proben 10–100-fach weniger Gesamtprotein (0,01–5 µg in weniger als 20 µl) eingesetzt werden (Abschn. 2.2.2)
- das maximal aufzutragende Volumen richtet sich nach der Dicke der verwendeten Abstandhalter/Schablonen, nach der Anzahl der Probentaschen pro Schablone sowie nach der Vollständigkeit der ausgebildeten Probentaschen, d.h. wie hoch die Stege zwischen den Taschen auspolymerisiert sind; für ein Minigel (Bio-Rad Mini Protean II) kann mit 0,75 mm dicken Abstandhaltern/Schablonen sowie 15 Taschen pro Schablone ca. 14 µl Probe pro Tasche aufgetragen werden
- hitzedenaturierte Proben vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 10.000 × g zentrifugieren, um unlösliche Bestandteile abzutrennen
- als Kontrolle bzw. Molekulargewichtsvergleich sollte pro Gel mindestens in einer Spur eine Standardproteinmischung (z.B. von Bio-Rad Laboratories, Sigma-Aldrich, GE Healthcare, Invitrogen GmbH; in verschiedenen Molekulargewichtsbereichen erhältlich) aufgetragen werden; Auftragsmenge und Probenvorbereitung sind den Herstellerangaben zu entnehmen; farbstoffmarkierte Proteinmischungen (z.B. ECL Plex Fluorescent Rainbow Marker, GE Healthcare) erlauben zum einen eine Laufkontrolle während der Elektrophorese und zum anderen eine einfache Identifizierung der Standardproteine nach erfolgter Elektrophorese; sie sind besonders empfehlenswert, falls nach erfolgter Elektrophorese die aufgetrennten Proteine weiterbearbeitet werden und z.B. ein Elektrobplot mit anschließender Immuno-detektion (Kap. 10) durchgeführt werden soll.

Elektrophorese

- Schablone aus dem auspolymerisierten Gel vorsichtig entfernen; dabei vermeiden, dass die Stege zwischen den Probentaschen zerstört werden
- Probentaschen sorgfältig mit Elektrodenpuffer spülen, um nicht polymerisiertes Acrylamid zu entfernen; es könnte nach Entfernen der Schablone weiter polymerisieren und ungleichmäßige Probentaschen verursachen
- Gelkassette nach Herstellerangaben in die Elektrophoreseapparatur einbauen
- beide Elektrodenkammern mit Elektrodenpuffer füllen und Luftblasen in den Probentaschen bzw. am unteren Rand der Gelkassette mit einer Spritze (mit gebogener Kanüle) entfernen
- Proben durch den Elektrodenpuffer hindurch mit einer Hamiltonspritze oder mittels Pipetten mit Einmalspitzen auf den Boden der Taschen eintragen; bei Verwendung einer Hamiltonspritze diese sorgfältig zwischen den einzelnen Probenauftragungen mit Elektrodenpuffer, Wasser oder Ethanol spülen
- in allen Taschen sollten möglichst gleiche Volumina eingetragen werden, um Verzerrungen während der Elektrophorese zu verhindern
- nicht benötigte Probentaschen sollten mit gleichem Volumen Probenauftragspuffer beladen werden, um ein Ausbreiten der Proben benachbarter Spuren zu verhindern
- Elektroden mit dem Stromgeber verbinden, Polarität oben (–), unten (+)

- Elektrophorese zunächst bei konstantem Strom von 10 mA (gilt für ein 0,75 mm dickes Gel) durchführen, bis die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht hat, anschließend den Strom auf 15 mA erhöhen; die Elektrophorese eines Standard-16cm-Gelsandwiches, 0,75 mm dick, benötigt bei konstantem Strom von 4 mA ca. 15 h (mit 15 mA 4–5 h); 0,75 mm dicke Minigele dauern 1–1,5 h
- Elektrophorese beenden, sobald die Bromphenolblau-Front den unteren Gelrand erreicht hat
- Gel aus der Kammer entnehmen und die Proteine mit gewünschter Methode, z.B. Coomassie Blau (Abschn. 2.2.1) oder Silberfärbung (Abschn. 2.2.2) nachweisen oder Gele zum Transfer der Proteine auf Membranen verwenden (Kap. 10).



Trouble Shooting

- Die Proteine wandern nicht oder nur geringfügig in das Trenngel ein: Die gewählte Acrylamidkonzentration ist zu hoch; Gel mit geringerer Acrylamidkonzentration verwenden.
- Das Polypeptid wandert mit oder kurz hinter der Bromphenolblau-Front: Die Acrylamidkonzentration ist zu gering; bei sehr komplexen Proteinlösungen Gradientengele verwenden (Abschn. 2.1.4).
- Die Referenzproteine wandern ins Gel, die Proteine aus den Proben jedoch nicht oder nur geringfügig: Die Beladung der Proteine mit SDS ist nicht ausreichend. In der Regel rührt dies von einem zu kleinen Volumenverhältnis von Probenlösung und Probenauftragspuffer her oder der pH-Wert des Denaturierungsansatzes liegt im sauren Bereich (Bromphenolblau-Farbe beachten).

Literatur

- Gallagher, S.R. (1995) in: Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W., Wingfield, P.T. (Hrsg.): One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, New York.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

2.1.2 Gelelektrophorese in Tris-Tricin-Puffersystemen

Die Trennung von Proteinen bzw. Proteinfragmenten unter 10–15 kDa ist mit dem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (Abschn. 2.1.1) nicht immer befriedigend. Die Beeinträchtigung der Auflösung begründet sich in der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit von kleinen Proteinen und SDS.

Das folgende Protokoll nach Schagger und von Jagow (1987) bedient sich zur Auftrennung kleiner Proteine eines anderen Puffersystems für die Gelelektrophorese. Bereits fertige Tricin-Gelsysteme werden von diversen Herstellern angeboten (Bio-Rad, Novex® Invitrogen GmbH). Gradientengele kommen zum Einsatz, falls ein größerer Molekulargewichtsbereich abgedeckt werden muss. Sind jedoch keine Proteine oberhalb von 100 kDa oder 70 kDa zu analysieren, wird die Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit uniformen Gelen empfohlen. Hinweise auf eine Auswahl von Geltyp und Trennsystem bei entsprechenden Trennproblemen sind in Tab. 2–3 gegeben, bzw. können bei den jeweiligen Herstellern von fertigen Gelsystemen eingesehen werden.



Materialien

- Die in Tab. 2–4 angegebenen Mengen für 30 ml Trenn- und 12,5 ml Sammelgellösung sind ausreichend für zwei Gele mit den Dimensionen von 0,75 mm × 16 cm × 16 cm (Protean II 16-cm, Bio-Rad; SE 400/600, GE Healthcare).
- 30 % (w/v) Acrylamid (Abschn. 2.1.1)
- Trenn- und Sammelgelpuffer: 3 M Tris-HCl, pH 8,45
- 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS): 0,2 g APS ad 2 ml H₂O
- 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS): 10 g SDS ad 100 ml H₂O

- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)
- Kathodenpuffer: 12,11 g Tris-Base, 17,92 g Tricin, 10 ml 10 % (w/v) SDS ad 1 l H₂O, den pH-Wert nicht einstellen, bei 4 °C bis zu 1 Monat lagerfähig
- Anodenpuffer: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9
- 2 × Tricin-Probenaufragspuffer: 1 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,8 g Natriumdodecylsulfat (SDS), 2,4 ml (3 g) Glycerin, 0,31 g Dithiothreitol (DTT), 2 mg Coomassie Blau G-250 ad 10 ml H₂O
- Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur mit Glasplatten, Abstandhaltern sowie Taschenschablonen
- Stromgeber



Durchführung

Herstellung des Polyacrylamidgels

Glasplatten sowie Gelkammer vorbereiten und Polyacrylamidgel herstellen wie in Abschn. 2.1.1 beschrieben; Trenn- und Sammelgellösung nach Tab. 2–4 zubereiten.

Probenvorbereitung

- Zu analysierende Proteinproben 1:1 mit 2 × Tricin-Probenaufragspuffer versetzen
- vor dem Gelauftrag die Proben 30–60 min bei 40 °C behandeln; falls Proteaseaktivität in den Proben vorhanden ist, wird empfohlen, die Proben 3–5 min bei 100 °C zu denaturieren.

Elektrophorese

Analog Abschn. 2.1.1 verfahren, jedoch die obere Pufferkammer mit Kathodenpuffer füllen, während in der unteren Pufferkammer der Anodenpuffer eingefüllt wird.

Tab. 2–3: Geltyp und Trennsystem

Gesamtbereich [kDa]	Geltyp	Trennsystem
6 bis größer 250	8–16% Gradient	Laemmli
2–100	10% einheitlich	Schägger
1–70	16,5%	Schägger
Optimaler Bereich [kDa]		
50–100	8%	Laemmli
20–60	13%	Laemmli
5–50	10%	Schägger
2–30	16,5%	Schägger
1–20	16,5% (H)	Schägger
(H): Hohe Konzentration an Quervernetzungsagens		
(Nach: Kellner et al. (1994): Microcharacterization of Proteins, VCH, Weinheim)		

Tab. 2–4: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die Tris-Tricin-Gelelektrophorese

Stammlösungen	Sammelgel 10%	Trenngel 4%
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	1,62 ml	9,8 ml
Trenn- und Sammelgelpuffer	3,10 ml	10 ml
10% SDS	0,094 ml	0,30 ml
H ₂ O	7,656 ml	6,73 ml
Glycerin	–	4 g (3,17 ml)
10% APS	25 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Literatur

- Gallagher, S.R. (1995) in: Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W., Wingfield, P.T. (Hrsg.): One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, New York.
- Schägger, H., 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.

2.1.3 Kontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Die kontinuierliche Gelelektrophorese zeichnet sich durch Einfachheit und Schnelligkeit aus, da hier sowohl zur Herstellung des Trenngels wie auch des Elektrophoresepuffers nur ein Puffer verwendet wird.

Im Gegensatz zur diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese werden jedoch eine geringere Auflösung und Bandenschärfe erzielt.



Materialien

Die in Tab. 2–5 angegebenen Mengen von 15 ml Trenngellösung sind ausreichend für ein Gel der Dimensionen 0,75 mm × 16 cm × 16 cm (Protean II 16 cm, Bio-Rad; SE 400/600, GE Healthcare)

- 30 % (w/v) Acrylamid (Abschn. 2.1.1)
- 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS): 20 g SDS ad 200 ml H₂O
- Trenngelpuffer (0,4 M Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,4 % (w/v) SDS): 46,8 g NaH₂PO₄ × H₂O, 231,6 g Na₂HPO₄ × H₂O, 120 ml 10 % (w/v) SDS ad 3 l H₂O
- 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS): 0,2 g APS ad 2 ml H₂O
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
- Elektrodenpuffer (0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,1 % (w/v) SDS): 500 ml Trenngelpuffer ad 2 l H₂O
- 2 × Probenauftragspuffer: 0,5 ml Trenngelpuffer, 2 ml 10 % (w/v) SDS, 0,1 mg Bromphenolblau, 0,31 g DTT, 2 ml Glycerin, ad 10 ml H₂O
- Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur mit entsprechenden Glasplatten, Abstandhaltern sowie Taschen-schablonen
- Stromgeber



Durchführung

Herstellung des Polyacrylamidgels

Vorbereitung von Glasplatten und Gelkammer, bzw. Herstellung des Polyacrylamidgels wie in Abschn. 2.1.1, jedoch das Trenngel nach Tab. 2–5 herstellen; die Trenngellösung bis zur oberen Begrenzung einfüllen, die Schablone für die Probenaschen einsetzen und das Gel 30–60 min bei Raumtemperatur polymerisieren lassen.

Probenvorbereitung

- Zu analysierende Proben 1:1 mit 2 × Probenauftragspuffer versetzen
- Proben anschließend 2 min bei 100 °C denaturieren.

Elektrophorese

- Wie in Abschn. 2.1.1 beschrieben verfahren; nachdem die Elektrophoresekammern mit Elektrodenpuffer gefüllt sind, die Proben in die Taschen eintragen und leere Taschen mit Probenauftragspuffer füllen
- Elektrophorese zunächst bei 15 mA durchführen bis der Blaumarker in das Gel eingetreten ist, dann den Stromfluss auf 30 mA hochregeln (0,75 mm × 16 cm × 16 cm Gele)

Gentechnische Methoden

Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das
molekularbiologische Labor

Jansohn, M.; Rothhämel, S. (Hrsg.)

2012, XXIII, 660 S., Softcover

ISBN: 978-3-8274-2429-7