

GPC/SEC von Proteinen

DR. DANIELA HELD, PSS

Problemstellung

Im Gegensatz zu den meisten anderen Makromolekülen sind viele zu untersuchende Proteine monodispers, d.h. sie haben keine Molmassenverteilung sondern eine definierte Molmasse. Allerdings aggregieren Proteine leicht und die Bestimmung der Anteile dieser Aggregate ist von großer Bedeutung.

Frage

Welche Besonderheiten gibt es bei der GPC/SEC-Methodenentwicklung für Proteine? Was sind geeignete Säulen und Detektoren für Proteinfragestellungen?

Antwort

Proteine zeichnen sich in der Regel durch zwei Besonderheiten aus: Zum einen haben sie keine breite Molmassenverteilung sondern sind monodispers. Zum anderen liegen viele Proteine globulär, d.h. in sehr kompakter Form, vor.

Bei der Säulenauswahl ist deshalb folgendes zu berücksichtigen:

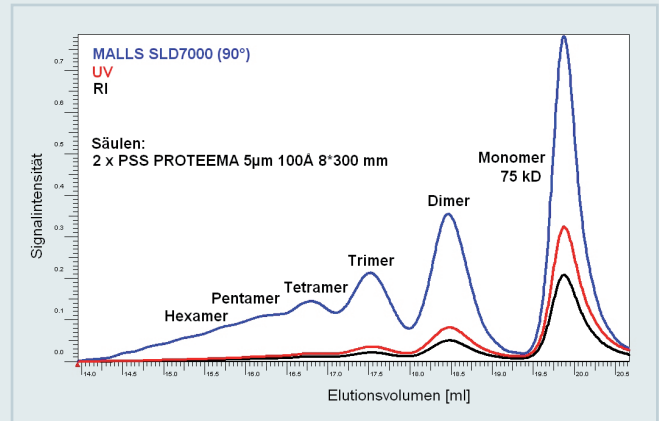
Für Proteine verwendet man am besten Säulen mit einem engen Molmassentrennbereich (Einzelporositätssäulen), dafür aber einer sehr guten Auflösung in diesem Molmassenbereich. Die verwendete Säule sollte also eine sehr flache Steigung der Kalibrierkurve im interessanten Molmassen-Bereich aufweisen.

Das Standard-Säulenmaterial für die Proteintrennung ist nach wie vor silikabasiert. Mittlerweile hat sich die pH-Stabilität dieser Säulen aber deutlich verbessert. pH-Werte von pH 2 bis 9 sind unproblematisch. Soll bei noch höheren pH-Werten gearbeitet werden (bis pH 13) oder erhält man keine wechselwirkungsfreie Chromatographie können alternativ methacrylatbasierte polymere Phasen verwendet werden.

Da viele Proteine globulär vorliegen, können auch bei großen Molmassen deutlich kleinere Partikelgrößen verwendet werden als bei synthetischen Polymeren. Durch die Verwendung der kleinen Partikel erhält man eine deutliche Verbesserung der Auflösung.

Der ideale Detektor zur Untersuchung von Proteinen und Aggregaten ist der molmassensensitive Lichtstreuendetektor, daher sollten die Säulen natürlich auch für Lichtstreuung geeignet sein. Hierfür werden zum Teil Spezialsäulen mit schnellen Einlaufzeiten und geringem Grundrauschen angeboten, mit denen der Anwender sehr schnell einsatzbereit ist.

Neben den Lichtstreuendetektoren (RALLS oder MALLS) eignen sich eigentlich fast alle Detektoren für die Proteincharakterisierung. Notwendig sind noch ein UV-Detektor (häufig eine



Aggregiertes BSA auf einer silikabasierten Säulenkombination; der Lichtstreuendetektor kann auch hochmolekulare Aggregate in kleiner Konzentration noch gut detektieren.

oder zwei feste Wellenlängen) oder ein Brechungsindexdetektor (RI). Die Lichtstreuendetektoren haben den Vorteil, dass hochmolekulare Aggregate auch bei niedrigen Konzentrationen (s. Abb.) gut detektiert werden. Das RI-Signal wird verwendet, um die Anteile der Aggregate genau zu bestimmen, mit dem UV-Detektor wird oft die Proteinkonzentration ermittelt. Weniger häufig eingesetzt (aber durchaus nicht weniger nützlich) sind Online-Viskositätsdetektoren oder dynamische Lichtstreuendetektoren in Online-Variante zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius.

Fazit

■ Für die Trennung von Proteinen eignen sich Einzelporositäts-Säulen mit einer möglichst flachen Kalibrierkurve am besten.

■ Für globuläre Proteine können zur weiteren Verbesserung der Auflösung kleine Partikelgrößen eingesetzt werden.

■ Da Lichtstreuung eine wichtige Detektionsmethode ist, sollten die Säulen lichtstreutauglich sein.

■ GPC/SEC-Säulen für Proteine stehen bis zum pH=9 (silikabasiert) bzw. pH=13 (polymerbasiert) zur Verfügung.

Alle bisher erschienenen Tipps & Tricks finden Sie online unter www.laborpraxis.de/tippsandtricks.

+49 (0) 61 31 / 9 62 39 - 0

Thema der nächsten Ausgabe: Unterschiede ELSD – Lichtstreuung in Lösung.