

Proteinanalytik mit GPC

Problemstellung

Es soll eine optimale Trennung der Proteine nach Molekülgröße erreicht werden.

Frage

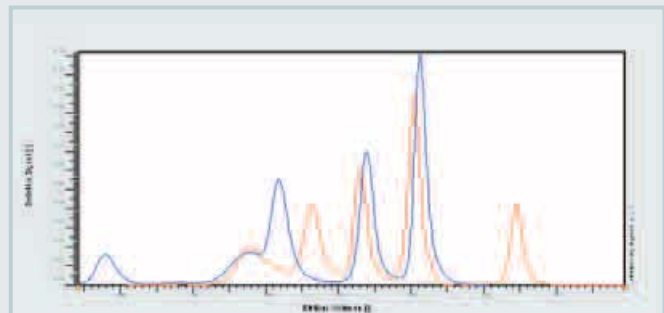
Welchen Einfluss haben Ionenstärke bzw. Salzkonzentration auf die Proteintrennung nach Molekülgröße?

Antwort

In Fortführung der Folge vier (Wechselwirkungen in der GPC) dieser Reihe soll gezeigt werden, wie eine Proteintrennung durch unterschiedliche Salzkonzentrationen beeinflusst werden kann.

Proteine als globuläre Strukturen werden in ihrem Elutionsverhalten stark von den äußeren funktionellen Gruppen oder Strukturen beeinflusst. Sind stark polare Gruppen an der Oberfläche angeordnet, besteht die Möglichkeit der Adsorption der Proteine an der Oberfläche der Säulenmaterialien. Dieser Adsorptionseffekt kann durch Zusatz von Salzen, also durch eine Erhöhung der Ionenstärke, vermindert oder unterbunden werden. Das Vorhandensein von Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial ist in der Gelfiltration von Proteinen unerwünscht und daher unbedingt zu unterbinden. Andererseits können unpolare Gruppen an der Proteinoberfläche eine hydrophobe Wechselwirkung eingehen. Dieser Effekt wird durch geringe Salzkonzentration oder durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln unterdrückt. Ein Beispiel für diese Anwendung ist die Messung der Aggregation von Insulin (PH. Eur. 4. Ausgabe, Grundwerk 2002), bei der Acetonitril und Essigsäure dem Eluenten zugesetzt werden.

Daher ist bei der Trennung der Proteine nach der Molmasse die Salzkonzentration im Eluenten zu optimieren. Erfahrungsgemäß verbessert sich die Trennung durch Einsatz höherer Salzkonzentrationen. Es besteht allerdings die Gefahr, dass einige Proteine wegen ihrer stark nichtlinearen Adsorptionsisotherme nicht mehr eluiert werden. D.h. Proteine oder generell Polymere haben unter isokratischen Bedingungen die Eigenschaft, dass entweder eine Elution erfolgt oder das Produkt adsorbiert wird.



Trennung einer Protein-Mischung in einem Phosphat-Puffer (blaue Kurve) und einem Phosphat-Puffer mit NaCl-Zusatz (rote Kurve)

Die Abbildung zeigt die Trennung von Thyroglobulin, Ferritin, γ -Globulin, Ovalalbumin, Myoglobin und Vitamin B12 bei unterschiedlichen Salzgehalten im ansonsten gleichen Phosphatpuffer. Die Abbildung macht deutlich, wie die Trennung durch Variation des Salzzusatzes beeinflusst werden kann. Der höhere Salzgehalt führt zu einer besseren Trennung der unterschiedlichen Proteine.

Fazit

Wichtig bei GPC und GPC-Kopplungsmethoden von Proteinen:

- Die chromatographischen Bedingungen für die Trennung der Proteine müssen optimiert werden.
- Eine Erhöhung der Polarität durch Zusatz von Salzen oder Verringerung der Polarität durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln kann erforderlich sein.
- Die Wirkung der Polarität auf unterschiedliche Proteine wird unterschiedlich sein.
- Drastische Bedingungen können dazu führen, dass einzelne Proteine nicht mehr eluieren.

Fax: +49 (0 61 31) 9 62 39 - 11

InfoClick

160665

Sie interessieren sich für eine vorherige Ausgabe der GPC Tipps & Tricks? www.laborpraxis.de und InfoClick genügt!

Ausgabe	Thema	InfoClick
LaborPraxis 10/2004	Warum ist das Detektorsignal so klein?	136393
LaborPraxis 11/2004	Wechselwirkungsfreie GPC-Messungen	138181
LaborPraxis 12/2004	Warum ist die GPC eine Relativmethode?	140562
LaborPraxis 1/2 2005	Molmassen mit universeller Kalibration bestimmen	142368
LaborPraxis 3/2005	Wie erkennt man ein Säulenmismatch?	144656
LaborPraxis 5/2005	Wie exakt ist die GPC?	149852