

Liebe Leser, diese Ausgabe der GPC Tipps & Tricks beschreibt die Proteinanalyse mit der GPC. Die nächste Ausgabe beschäftigt sich ebenfalls mit der Protein-Analytik, im besonderen mit Salzeffekten und Proteinfragmenten.
Autor: Dr. Thorsten Hofe, PSS

Proteinanalytik mit GPC

Problemstellung

Unterschiedlich große Proteine sollen voneinander separiert und die Proteindimension in Lösung bestimmt werden.

Frage

Kann die GPC zur Strukturaufklärung, Fraktionierung oder Aufreinigung von Proteinen beitragen?

Antwort

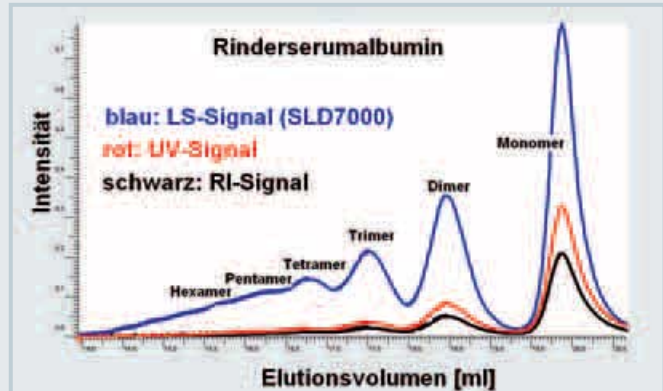
Proteine sind aus unterschiedlichen Aminosäuren (Monomeren) aufgebaut und bilden verschiedene Überstrukturen aus (Primär- und Sekundärstrukturen). Ihr Eigenschaftsprofil ist eine Funktion der Zusammensetzung (Aminosäuresequenz) und der entsprechenden Überstruktur.

Je größer die Molmassen der Proteine desto schwieriger wird die Separation mittels HPLC (nicht lineare Adsorptions-Isotherm). Der Einsatz eines Lösungsmittelgradienten erschwert die Bestimmung von Strukturinformationen in Lösung mit Hilfe molmassensensitiver Detektoren. Vorteile bietet hier die GPC. Unter isokratischen Bedingungen werden Moleküle nach Größe separiert und können anschließend hinsichtlich Dimension und Molmasse untersucht werden.

Die Bestimmung der Molmasse und die Untersuchungen der Variation der Proteindimension (Faltung des Proteins, also z.B. die Helix-Knäuel-Umwandlungen als Funktion der Temperatur oder des pH-Wertes) sind ebenso von Interesse wie z.B. die Frage in welchem Assoziationsgrad die Proteine vorliegen (Monomere, Dimere, Trimere oder höher assoziierte Produkte). Diese Fragestellungen können mit einer GPC-Lichtstreuungkopplung erfolgreich beantwortet werden.

Nicht zuletzt die Fraktionierung unterschiedlich großer Proteine bzw. Peptide oder die Aufreinigung der Proteine (Abtrennung von Peptiden und Enzymen oder Proteinfragmenten) ist für die Forschung und Qualitätskontrolle von großem Interesse. All dies gelingt hervorragend durch Größenseparation mittels GPC.

Methodisch wird an die GPC-Säule bei der Proteinanalytik ein spezifisches Anforderungsspektrum gestellt. Dies sind u.a. minimale Wechselwirkungseigenschaften, eine optimierte Partikelgrößenverteilung, sehr selektive Porengrößenverteilung



1 BSA-Protein, zerlegt in seine assoziativen Bestandteile

(Messbedingungen: Konzentrations-Detektor, MALLS-Detektor SLD7000, 2 St. Proteoma Säulen (300Å, 8x300mm), Raumtemperatur, Flussrate 0,5 ml/min)

und eine sehr hohe Auflösung in begrenztem Molmassenfenster. Neu auf dem Markt angebotene Protein-Säulen erfüllen diese Anforderungen auf hervorragende Weise.

Als Eluent (je nach Protein) eignet sich ein wässriger Phosphatpuffer mit Salzzusatz. Die Abbildung 1 zeigt die Sensitivität einer GPC-MALLS-Kopplung zur Bestimmung des Assoziationsgrads eines Bovine Serum Albumin (BSA) Proteins. Die Proteinaktivität ist meist eine Funktion des Aggregationsgrades. Die Quantifizierung der Assoziation dient in diesem Fall der Qualitätskontrolle. Der Einsatz eines MALLS-Lichtstreu-Detektors erlaubt auch die Bestimmung der Proteindimension (Rg) in Lösung.

Fazit

GPC und GPC-Kopplungsmethoden erlauben:

- die Bestimmung von Molmassen und Moleküldimensionen (Faltung),
- die Fraktionierung unterschiedlich großer Proteine,
- die Quantifizierung des Assoziationsgrades (QC) und
- die Molmassenbestimmung von Proteinfragmenten (z.B. Gelatine).

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

InfoClick

157940

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