

## Praktikumsanleitung: Proteine III – Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

**Lerninhalt:** Proteinanalytische Methoden: Elektrophorese, Färbung und Molekulargewichtsbestimmung, Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur, Denaturierung, Färbe- und Nachweismethoden

**Geräte:** Pipetten, Eppendorf-Tubes, Wasserbad oder Heizblock, Elektrophoreseeinheit, Powersupply, Färbewanne; Gelkammer, Gießständer

### **Hintergrund:**

#### **SDS-PAGE**

Die Gel-Elektrophorese dient der Analyse komplexer Proteinmischungen und ermöglicht den schnellen Nachweis zu identifizierender Proteine und deren Molekulargewichts-Bestimmung. Die SDS-PAGE wird standardmäßig zur Trennung von Proteingemischen eingesetzt.

SDS ist ein anionisches Detergenz, das an hydrophobe Teile der Proteine bindet, wodurch sich die Moleküle entfalten und ihre Eigenladungen so effektiv überdeckt werden, daß Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4g SDS pro 1g Protein)

Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt, und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst.

Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, z.B. 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), aufgespalten (Auflösen der Quartärstruktur).

Dadurch wird gewährleistet, daß nur die Größe (molare Masse) des Proteins als Trennkriterium wirkt. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der stark negative SDS-Protein Komplex im elektrischen Feld zum +-Pol.

Die Elektrophorese erfolgt in einem – von U.K. Laemmli eingeführten - diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel (Tris-HCl-Puffer pH 6,8; 3-4% Acrylamid) überschichtet ein engmaschiges Trenngel (Tris-HCl-Puffer pH 8,8; 5-20% Acrylamid). Der pH Wert des Sammelgels liegt sehr nahe am isoelektrischen Punkt des Glycins im Elektrodenpuffer. Dadurch hat Glycin am Beginn der Trennung eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität („Folgeion“). Die Chloridionen in den Gelpuffern haben hingegen eine sehr hohe Mobilität („Leitungen“). Beim Probenauftrag auf das weitmaschige Sammelgel liegen die Mobilitäten der Protein-Ionen zwischen den Folgeionen und den Leitungen. Beim Anlegen des elektrischen Feldes beginnen in diesem diskontinuierlichen System alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit zu wandern. Im Bereich der Ionen mit hoher Mobilität (Leitungen) stellt sich eine niedrige Feldstärke ein. Im Bereich der Ionen mit niedriger Mobilität (Folgeionen) ist die Feldstärke sehr hoch. Somit befinden sich die Proteine in einem Feldstärkegradienten und bilden während der Elektrophorese einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten („stacking“-Effekt). Die Protein-Ionen mit der höchsten Mobilität folgen unmittelbar dem Leit-Ion, die mit der niedrigsten Mobilität werden vor den Folge-Ionen hergeschoben. Wandert eine Komponente in die Zone höherer Mobilität, ist sie im Bereich niedrigerer Feldstärke und fällt zurück, wandert eine Komponente zu langsam, wird sie durch die höhere Feldstärke in diesem Bereich nach vorne beschleunigt. Der Stapeleffekt hat mehrere Vorteile: Die Proteine wandern langsam in die Gelmatrix und aggregieren nicht mehr. Dadurch erfolgt eine Vortrennung und Aufkonzentrierung der einzelnen Proteinklassen beim Start.

Beim Auftreffen auf das engporige Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand, es entsteht ein „Stau“, was zur weiteren Zonenschärfung führt. Das niedermolekulare Glycin (Folgeion) wird dadurch nicht beeinflusst und überholt die Proteine. Diese befinden sich jetzt in einem homogenen Puffer, wodurch sich der Stapel auflöst und sich die Komponenten aufzutrennen beginnen. Im Trenngel wirkt auf alle Proteine die gleiche Feldstärke und ausschließlich die Größe ist für die Wandergeschwindigkeit ausschlaggebend.

Als Trägermatrix wird standardmäßig Polyacrylamid verwendet. Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED und APS.

**Acrylamid:** ist ein Neurotoxin und muß entsprechend vorsichtig verwendet werden. Während der Polymerisation wird Acrylamid zu Polyacrylamid und ist in diesem Zustand ungefährlich. Je nach Menge an Polyacrylamid im Gel lassen sich Proteine unterschiedlicher Größe trennen. Polyacrylamid selbst ist eine viskose Flüssigkeit, aber kein Gel. Geleigenschaften erhält es erst durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer (meist N,N' – Methylenebisacrylamid). Die Porengröße wird durch die Totalacrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad definiert. Polyacrylamidgele sind chemisch inert und besonders stabil.

**APS** (Ammoniumpersulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ): dient als Radikalbildner für die Polymerisation von Acrylamid, die als Radikalkettenreaktion abläuft. APS bildet im Wasser freie Radikale ( $\text{SO}_4^-$ ), die mit Acrylamid reagieren. Das entstandene Acrylamidradikal kann mit einem weiteren Acrylamidmolekül (Monomer oder Polymer) weiterreagieren.

**TEMED** (N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin): dient als Katalysator der Polymerisation, indem es die Radikalbildung von APS erleichtert und dabei selbst ein stabileres Radikal darstellt. Die Vernetzung der Monomere wird also durch die beiden Katalysatoren APS und TEMED ausgelöst.

Die Polymerisation erfolgt unter Luftabschluss, da Sauerstoff zum Kettenabbruch führt. Um reproduzierbare Ergebnisse mit der SDS-PAGE zu erhalten, ist es daher notwendig, die Gellösung vor Zugabe der Katalysatoren zu entgasen.

Je länger das Trenngel, desto besser erfolgt die Trennung. Je dünner das Gel, desto schöner die Banden und desto weniger Probenmaterial kann geladen werden. Bei 1,5 mm dicken Gelen und 0,5 cm breiten Slots (Geltaschen) liegt die obere Grenze der Auftragsmenge bei 500µg Proteingemisch/Slot oder etwa 10µg Reinprotein/Slot.

Die Konzentration der Trenngele sollte wie folgt gewählt werden:

MW 10-60 kD: 15% Trenngel  
MW 30-120 kD: 10% Trenngel  
MW 50-200 kD: 8% Trenngel

Gradientengele (z.B.: 8-15%) geben einen breiteren Trennbereich und deutlich schärfere Banden. Diese Gradienten werden mit Hilfe eines Gradientenmischers erzeugt.

Folgende **Probleme** können bei der **SDS-PAGE** auftauchen:

- Beim Arbeiten mit Acrylamid bieten auch Handschuhe keinen effizienten Schutz vor den toxischen Monomeren. Daher sollte man statt dem Einwiegen besser fertige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösungen verwenden. Selbst auspolymerisierte Gele können noch Reste an monomerem Acrylamid enthalten und sind daher genauso giftig.

- Bei schlechter Polymerisation der Gele sollte man das APS frisch lösen. Bei höheren Temperaturen erfolgt eine bessere Polymerisation (Wärmeschrank).
- Zu langes Aufkochen spaltet empfindliche Proteine; Membranproteine können beim Kochen mit SDS und Mercaptoethanol aggregieren – dann hilft Erwärmen bei nur 40°C.
- Bei unvollständiger Reduktion sollte man frisch aufgetaute DTT Aliquots (-20°C) verwenden.
- Schlierige DNA oder RNA Verunreinigungen von z.B. Kernlysaten lassen sich mit DNaseI und RNase A Verdau effektiv entfernen.
- Der pH des Laufpuffers darf nicht mit HCl eingestellt werden, weil dadurch der „stacking“-Effekt nicht funktioniert und nur die Chloridionen wandern, bis sie aufgebraucht sind. Dadurch ergeben sich lange Laufzeiten und ungenügend aufgelöste Banden! Durch exaktes Einwiegen von Tris und Glycin ergibt sich der richtige pH.
- Hydrophile Zucker glycosylierter Proteine binden kein SDS, laufen daher im Gel atypisch und erzeugen breite Banden. Phosphorylierung von Proteinen verändert ihr Laufverhalten ebenfalls.
- Hohe Ionenkonzentration in den Proben führt zu Bandenverzerrungen. Hier kann eine Fällung mit Chloroform/Methanol helfen.

**Färben:** Die Proteine können nach erfolgter Trennung direkt im Gel gefärbt werden. Der seit den 60er Jahren am häufigsten verwendete Farbstoff ist Coomassie-Brilliant-Blue. Diese Färbung ist einfach und rasch durchzuführen. Gleichzeitig mit der Färbung werden die Proteine auch im Gel fixiert. Dies erfolgt durch eine Mischung Ethanol/Essigsäure/Wasser, in der der Farbstoff enthalten ist. Mit dieser Färbung erreicht man eine Nachweisgrenze von 0,1 bis 1µg.

Eine ebenfalls häufig eingesetzte Methode ist die Silberfärbung (silver stain). Hier erreicht man Nachweisgrenzen im ng Bereich. Allerdings ist diese Färbung kompliziert und langwierig. Zudem färben verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität.

**Molekulargewichtsbestimmung:** Um die Größe der Proteine bestimmen zu können, wird auf jedes Gel ein Marker aufgetragen, der Proteine mit bekanntem Molekulargewicht enthält. Die Wanderungstrecke der Proteine steht in linearem Verhältnis zum Logarithmus der Molekulargewichte. Somit läßt sich anhand der relativen Laufweite zu den Markerbanden das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins ermitteln.

### **Aufgabenstellung:**

- A) Gießen des Sammelgels auf ein vorbereitetes Trenngel
- B) Probenvorbereitung durch Kochen in SDS Probenpuffer
- C) Auftragen der Proben und Start der Elektrophorese
- D) Gießen eines Trenngels
- E) Färben zum Nachweis der Proteine

#### A) Gießen des Sammelgels

Von einem vorbereiteten Trenngel wird das Butanol abgeleert und die Oberfläche des Gels kurz mit Wasser gespült. Die Sammelgellösung (4%) wird nach dem Entgasen und der Zugabe der Katalysatoren bis zum Überlaufen in die Gelkammer pipettiert. Dann wird der Probenkamm in das Sammelgel gesteckt und das Gel für 15-30min zur Polymerisation stehen gelassen.

#### B) Probenvorbereitung

20µg Protein werden mit Wasser auf ein Volumen von 10µl eingestellt, mit 10µl Probenpuffer gemischt und 5min aufgeköcht. Im Probenpuffer ist Bromphenolblau enthalten. Dieser Farbstoff interagiert nicht mit Proteinen. Er hat die Eigenschaft, gleich schnell wie Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 5 kD zu wandern und dient als Marker für die Dauer der Elektrophorese.

#### C) Probenauftrag und Elektrophorese

Je 2 Gele werden mit dem SDS-Modul zusammengebaut. Der dadurch entstandene Kathodenraum wird vorsichtig mit Laufpuffer gefüllt. Dieses Sandwich wird in die Elektrophoresekammer eingehängt. In der Elektrophoresekammer (Anodenkammer) muß genügend Laufpuffer enthalten sein, um einen geschlossenen Stromkreis von der Kathode über die Gele zur Anode zu erzeugen. Nach vorsichtigem Herausziehen des Kammes wird mit Laufpuffer aufgefüllt und die vorbereiteten Proben mit einer Pipette in die Slots aufgetragen. Durch das im Probenpuffer enthaltene Glycerin sind die Proben schwerer als der Puffer und sinken auf den Boden der Slots ab („Unterschichten“).

Über den Deckel der Elektrophoresekammer wird die Stromversorgung mit dem Spannungsgerät hergestellt. Die Elektrophorese läuft zuerst ca. 15 min bei 100V, damit sich die Proteine im Sammelgel ordnen können, anschließend trennen wir die Proteine bei 150V ca. 60-90 min auf.

#### D) Gießen des Trenngels

Während der Elektrophorese wird das Trenngel für eine nachfolgende Arbeitsgruppe vorbereitet.

Glasplatten und Abstandhalter werden sorgfältig mit einem Detergenz gereinigt und anschließend ausreichend mit Wasser gespült.

Nach dem Trocknen werden innere Glasplatte / Abstandhalter / äußere Glasplatte mit dem Gelhalter fixiert und im Gießständer eingespannt. Um ein Auslaufen der Gellösung zu verhindern, kann vor dem Einspannen die Unterseite der Platten mit Parafilm abgedichtet werden.

5ml einer 10%igen Trenngellösung werden hergestellt, entgast und nach Zugabe der Katalysatoren wird das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen. Um einen perfekten Luftabschluss zu erreichen, wird das Gel mit wassergesättigtem Butanol überschichtet (Alkohol ist sehr viel leichter als eine wässrige Lösung, da aber jeder Alkohol dehydrierend wirkt, muss auch Butanol mit Wasser abgesättigt werden). Die Polymerisationszeit soll mindestens 30 - 60 Minuten betragen. Es ist von Vorteil, Trenngele am Vortag zu gießen, da eine sogenannte Nachpolymerisation bessere und reproduzierbarere Ergebnisse liefert (genauere Porengröße). Zur Lagerung bei 4°C ü.N. wird das Gel zusätzlich mit Parafilm abgedeckt.

#### E) Färbung

Nach der Elektrophorese werden die Gele aus der Apparatur genommen, in Färbewannen überführt, und soviel Färbelösung zugegeben, daß das Gel schwimmen kann. Nach Abschluss der Färbung wird die Coomassie-Lösung abgegossen und durch Entfärber ersetzt. Dadurch wäscht man den Farbstoff, der in das Gel eindiffundiert ist, aber nicht an Proteine gebunden hat, aus. Der Entfärber wird mehrmals gewechselt.

## Lösungen

### *Acrylamidstock*

30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid (37,5:1)

gebrauchsfertige Lösung

### *Trenngelpuffer*

0,8% SDS  
1,5M Tris pH 8,8

0,8g  
18,17g / 100ml

### *Sammelgelpuffer*

0,4% SDS  
0,25M Tris pH 6,8

0,4g  
3,0g / 100ml

### *Laufpuffer(10x)*

0,192M Glycin  
0,1% SDS  
0,025M Tris pH 8,3

144g  
10g  
30,29g / 1l

### *Probenpuffer*

0,1M DTT  
5,0% SDS  
25,0% Glycerin  
0,06M Tris pH 6,8  
+Spatelspitze Bromphenolblau

0,15g  
0,5g  
2,5g  
0,073g / 10ml

### *Färber*

0,5% Coomassie Blue  
50,0% Methanol  
10,0% Essigsäure

5,0g  
500,0ml  
100,0ml / 1l

### *Entfärber*

25,0% Ethanol  
10,0% Essigsäure

250,0ml  
100,0ml / 1l

### *Ammoniumpersulfat*

10,0% Ammoniumpersulfat

0,1g /ml

## **Trenngelzusammensetzung** (für 10ml) einer 10%-igen Lösung:

3,3 ml Acrylamidstock  
2,5 ml Trenngelpuffer  
4,2 ml H<sub>2</sub>O  
5 µl TEMED  
33 µl Ammoniumpersulfat

**Sammelgelzusammensetzung** (für 10 ml) einer 4%-igen Lösung:

1,3 ml Acrylamidstock

5 ml Sammelgelpuffer

3,7 ml H<sub>2</sub>O

10µl TEMED

60µl Ammoniumpersulfat