



UNIVERSITÄT
LEIPZIG

Praktikum Trennmethoden

SoSe 2021

Protokoll

E1 - Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Betreuer: Prof. Dr. Ralf Hoffmann

Franz Thiemann (3750567)

Georg Müller ()

Versuchsdurchführung: 26.07.2021

Protokollabgabe: 22.09.2021

Inhaltsverzeichnis

1 Aufgabenstellung	3
2 Chemikalien	3
3 Geräte und Materialien	3
4 Durchführung und Beobachtungen	4
4.1 Gießen des Gels	4
4.2 Probenvorbereitung	4
4.3 Gelelektrophorese	4
4.4 Anfärben der Proteine	4
5 Auswertung	5
5.1 Kalibriergerade	5
5.2 Bestimmen der Molekulargewichte	6
5.3 Vergleich mit Datenbankquellen und Interpretation	7
5.4 Abschätzen der Proteinmenge	8
5.5 Fehlerbetrachtung	9
6 Literatur	9

1 Aufgabenstellung

Mithilfe der SDS-PAGE soll die molare Masse eines unbekanntes Proteins **X** und dem verdauten sowie unverdauten menschlichen γ -Globulin relativ zu einem Gemisch aus Protein-Standards ermittelt werden. Des Weiteren soll die Konzentration des Proteins **X** relativ zu einer zuvor erstellten Verdünnungsreihe bestimmt werden.

2 Chemikalien

- Tris-HCl-Lösung
- Glycerol
- SDS (Natriumdodecylsulfat)
- β -Mercaptoethanol
- Bromphenolblau
- Glycin
- Tris
- HCl (Salzsäure)
- APS (Ammoniumperoxodisulfat)
- Comassie-Lösung
- Ethanol
- Isopropanol

3 Geräte und Materialien

- Gelelektrophorese-Kit: Gelgießstand, Verdichtungsmatten, Spacer, Glasplatten, Gelplattenklemme, Elektrophorese-Zelle, Gelkamm, Probenauftragehilfe
- Mikropipetten in verschiedenen Größen mit Spitzen
- Volpipetten (Glas und Einweg), Pipettierhilfe
- Filterpapier
- Tischzentrifuge, Vortexer
- Petrischale
- Flakon
- Becherglas

4 Durchführung und Beobachtungen

4.1 Gießen des Gels

Vor dem Aufbau des Gelgießstands wurden alle Komponenten mit Ethanol gereinigt und getrocknet. Das Zusammenbauen erfolgte nach Anleitung. Trenngel und Sammelgel wurden nach dem Praktikumsskript¹ hergestellt. Dabei war darauf zu achten, dass APS und TEMED als Letztes hinzugegeben werden, da dies die Polymerisation startet. Von dem hergestellten Trenngel sollten 4,6 ml mit einer Einweg-Pipette zwischen die Glasplatten gegeben werden. Das Trenngel wurde anschließend mit Sammelgel überschichtet, bis die Füllhöhe 0,5 cm unter der Oberkante erreicht wurde. Anschließend wurde der Gelkamm eingesetzt. Nach 30 min ist das Gel fest genug, dass der Gelkamm entfernt werden kann. Da das Gel bis zu 12 Stunden zur vollständigen Polymerisation benötigt, wurde mit dem Gel der Gruppe des Vortags weitergearbeitet.

4.2 Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurden 20 μ l von Probe **E1** entnommen und mit 20 μ l Probenpuffer (**PP**) versetzt um Probe **E2** zu erhalten. Dies wurde anschließend mit Probe **E2** und **E3** wiederholt, um schließlich Probe **E4** zu erhalten.

4.3 Gelelektrophorese

Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Dichtheit dieser mit etwas VE-Wasser überprüft. Der Laufpuffer wurde durch das Mischen eines 10-fach-Laufpuffers mit Wasser im Verhältnis 1:10 hergestellt und in beide Kammern eingefüllt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Probenaschen mit Puffer bedeckt sind. Anschließend wurde die Probenauftragehilfe montiert und die Proben vorsichtig hinzugegeben. Durch den enthaltenen Probenpuffer besitzen die Proben eine höhere Dichte als der Laufpuffer und sinken in der Tasche nach unten. Nach dem Auftragen der Proben wird der Deckel der Elektrophoresekammer aufgesetzt und die Spannungsversorgung bei 200 V angeschaltet. Nach 55 min wurde die Elektrophorese beendet.

4.4 Anfärben der Proteine

Nach der Elektrophorese wird das Gel, durch vorsichtiges Aufhebeln der Glasplatten entnommen und in eine Petrischale gelegt. Zum Waschen des Gels wurde dieses zunächst 3 Mal je 5 min mit 25 ml VE-Wasser geschwenkt. Anschließend erfolgt das Einfärben mit 25 ml Comassie-Lösung für 60 min. Nach dem Färben wird die Comassie-Lösung entfernt und mit VE-Wasser ersetzt. Um die Farbe aus dem proteinfreien Gel herauszuwaschen, wird das Wasser jede Stunde gewechselt. Dies wurde für die Gele der Vorgängergruppe über den Tag verteilt durchgeführt.

5 Auswertung

5.1 Kalibriergerade

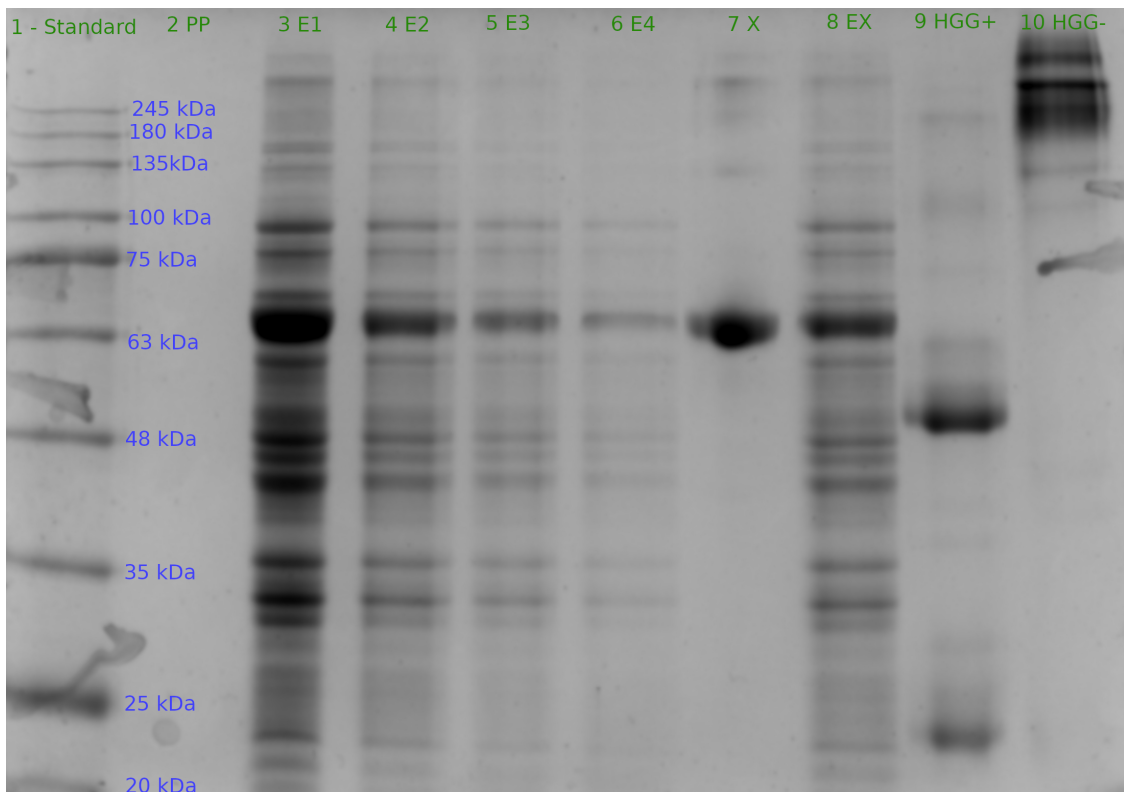


Abbildung 1: Beschriftetes Foto des Gels, alle Auswertungen wurden anhand dieses Fotos vorgenommen

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden der dekadische Logarithmus der Molekulargewichte der Protein-Standards in Abhängigkeit der Laufstrecken bzw. R_f -Werte dargestellt. Da das Gel als Bild zugesendet wurde, wurden die Längen in Pixel ermittelt und anschließend für eine Auflösung von 600 ppi umgerechnet. Die R_f -Werte wurden mit der folgenden Formel berechnet:

$$R_f = \frac{s_x}{s_f} \quad (1)$$

Wobei s_x die Laufstrecke einer Bande beschreibt und s_f in diesem Fall die Länge des Elektrophorese-Gels, welche 65.11 mm beträgt. Durch das verwenden von R_f -Werten ist die Kalibriergerade unabhängig von der nicht exakt bekannten Größe des Gels. Die folgenden Punkte wurden für eine Kalibriergerade verwendet:

Tabelle 1: Zur Erstellung der Kalibriergerade verwendete Werte

Markerbande	Strecke in mm	R_f -Wert	Molekülmasse (MW) in kDa	lg(MW)
1	8.34	0.13	245	2.39
2	10.41	0.16	180	2.26
3	12.83	0.20	135	2.13
4	17.02	0.26	100	2.00
5	20.06	0.32	75	1.88
6	26.80	0.41	63	1.80
7	35.44	0.54	48	1.68
8	46.11	0.71	35	1.54
9	57.28	0.88	25	1.40
10	64.36	0.99	20	1.30

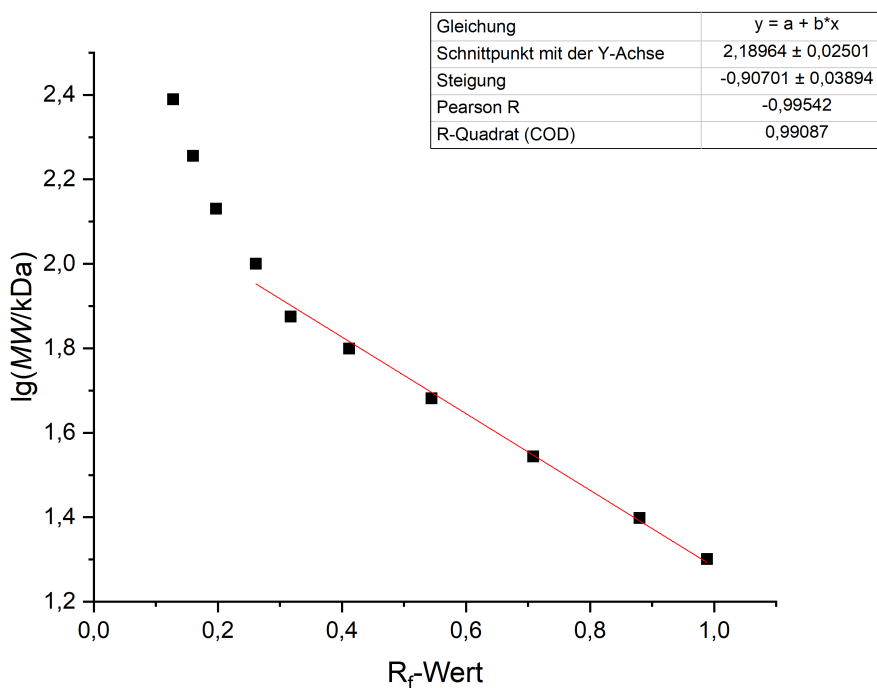


Abbildung 2: Kalibriergerade mit Fitparametern

Im Bereich hoher Molmassen verhält sich die Kalibrierkurve nicht linear, daher wurde die Kalibriergerade nur an den Bereich von Molekulargewichten kleiner als 135 kDa gefittet.

5.2 Bestimmen der Molekulargewichte

Mit der Kalibriergerade kann den Banden der unbekanntenen Proben ein Molekulargewicht zugeordnet werden:

$$MW = 10^{a+b \cdot R_f} \quad (2)$$

Die Parameter für a und b können aus Abbildung 2 entnommen werden.

$$a = 2.17964 \quad (3)$$

$$b = -0.90701 \quad (4)$$

Tabelle 2: Laufstrecken, R_f -Werte und Molekulargewichte der Proben

Probe	Laufstrecke in mm	R_f -Wert	Aus Fitgeraden berechnete Masse
Protein X	26.5	0.41	64.6
HGG+	34.12	0.52	50.6
	60.54	0.93	21.7
HGG-	4.02	0.06	132.9
	6.22	0.10	123.9

5.3 Vergleich mit Datenbankquellen und Interpretation

Protein X zeigt mit einer Laufstrecke von 26.5 mm einen R_f -Wert von 0.41 und besitzt damit nach der in Abbildung 2 bestimmten Kalibriergeraden eine Molekülmasse von 64.4 kDa

$$MW = 10^{2 \cdot 2.17964 - 0.90701 \cdot 0.41} = 64.6 \text{ kDa} \quad (5)$$

Die durch die Kalibriergerade berechnete Masse stimmt mit der aus dem Diagramm ablesbaren Masse überein, da sich diese im linearen Bereich der Fitgerade befindet. Neben der Hauptbande des Proteins X sind in den Proben **E1** bis **E4** noch weitere Nebenbanden erkennbar. Diese sind auf das *E. coli* Lysat zurückzuführen.

Das humane γ -Globulin besteht aus einer schweren Y-Kette mit einer Masse von ca. 50 kDa und zwei leichteren Ketten mit Massen von ca. 25 kDa. Die Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden.² In der verdauten Probe **HGG+** sind zwei Banden mit den Laufstrecken von 34.12 mm und 60.54 mm zu erkennen. Nach Gleichung (2) ergeben sich für diese Banden die Molekulargewichte von 50.6 kDa und 21.7 kDa. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Disulfidbrücken reduziert und die Ketten somit getrennt wurden. Die berechneten Molekülmassen stimmen in etwa mit denen der Literaturquelle² überein. Die Abweichungen lassen sich sowohl durch den Fitfehler, welcher in Kapitel 5.5 näher diskutiert wird, als auch durch die Funktion der γ -Globuline erklären: Diese werden im menschlichen Körper als Antikörper eingesetzt und enthalten dafür DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge von verschiedenen Antikörpern. Aufgrund der vielfältigen Fragmente variieren die γ -Globuline in ihrer Molekülmasse. Die unverdaute **HGG--** Probe legte hingegen nur eine kurze Laufstrecke zurück und erzeugte zwei Banden bei 4.02 mm bzw. 6.22 mm. Nach der Kalibriergeraden ergeben sich demnach Molekülmassen von 132.9 kDa und 123.9 kDa. Da sich diese Molekülmassen allerdings weit außerhalb des linearen Bereichs des Fits befinden, sind diese aufgrund des kurzen Laufwegs stark fehlerbehaftet. Die hohe Molekülmasse zeigt, dass die Disulfidbrücken in diesem Fall noch erhalten sind. Das Gesamtprotein besitzt eine Literaturmasse² von ca. 100 kDa, die aufgrund der eingebauten DNA-Fragmente leicht variieren kann. Die Masse des Proteins ist größer als die Summe der Massen der Fragmente in der **HGG--** Probe

5.4 Abschätzen der Proteinmenge

Aus der Betrachtung der Verdünnungsreihe **E1** bis **E4** kann eingeschätzt werden, dass sich die Proteinmenge in der Probe **EX** zwischen der Menge in **E1** ($2\ \mu\text{g}$) und der in Probe **E2** ($1\ \mu\text{g}$) liegt. Die schmale Breite der Bande und der nicht vollständig schwarze Farbton deuten darauf hin, dass die Probenmenge näher an $1\ \mu\text{g}$ als an $2\ \mu\text{g}$ liegt. Es wird daher eine Probenmenge von $1.3\ \mu\text{g}$ für die Probe **EX** geschätzt.

Um diese Schätzung zu bestätigen wurde eine computergestützte Auswertung des Bilds vorgenommen. Dazu wurden die Banden aus dem Bild des Gels ausgeschnitten und in eine Liste von Farbwerten umgewandelt. Anschließend wurden diese invertiert (von 255 subtrahiert), damit ein positives Signal entsteht. Zur Entfernung des Hintergrunds wurde die Probenpuffer-Spur (**PP**) von diesen Werten subtrahiert. Im Folgenden wurden die Werte integriert, um für jede Probe **E1** bis **E4** ein Integral zu erhalten und grafisch in Abhängigkeit der Proteinmenge dargestellt und linear gefittet. Dabei wurde die folgende Fitgleichung ermittelt:

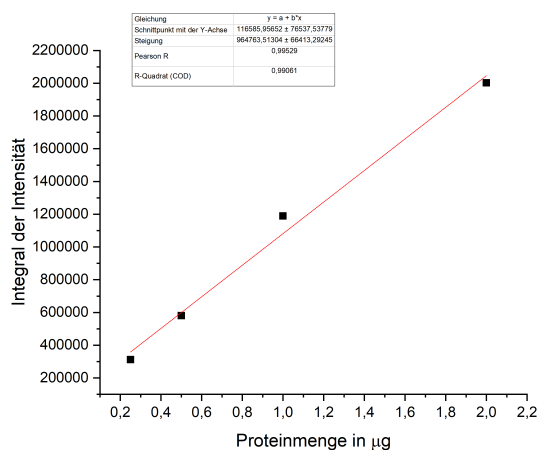


Abbildung 3: Intensitäts-Kalibriergerade

$$I = 116585 + 964\,763\ \mu\text{g}^{-1} \cdot m \quad (6)$$

$$m = \frac{I - 116585}{964\,763\ \mu\text{g}^{-1}} \quad (7)$$

Dabei ist I die integrierte Intensität und m die Proteinmenge in μg . Für die zu untersuchende Probe **EX** wurde eine integrierte Intensität von 1284469 ermittelt:

$$m = \frac{1284469 - 116585}{964\,763\ \mu\text{g}^{-1}} = 1.21\ \mu\text{g} \quad (8)$$

Die somit ermittelte Proteinmenge stimmt damit näherungsweise mit der durch Betrachtung abgeschätzten Proteinmenge überein. Die Näherungen dieser Methode werden in der Fehlerbetrachtung (5.5) diskutiert.

5.5 Fehlerbetrachtung

Während der Herstellung des Gels wurde das Volumen des zu nutzenden Trenngels nicht abgemessen. Die Füllhöhe des Trenngels wurde nach Rücksprache mit dem Assistenten nach Gefühl eingestellt, könnte aber von der empfohlenen Höhe leicht abweichend gewesen sein. Als Folge kann auch die Sammelgel-Schichtdicke von der erwarteten Schichtdicke leicht abweichen. Im Vergleich mit anderen Versuchsgruppen konnte aber kein sichtbarer Unterschied in der Höhe des Trenn- und Sammelgels festgestellt werden.

Beim Beladen der Proben wurde der Proteinstandard fälschlicherweise in Slot 1 des Gels gefüllt. Der Probenpuffer (**PP**) der eigentlich für Slot 1 vorgesehen war, musste daher in Slot 2 gefüllt werden. Es ist nicht zu erwarten, dass die Versuchsergebnisse durch diesen Fehler beeinflusst wurden. Der Graph der logarithmierten Molekulargewichte in Abhängigkeit der Laufstrecke zeigt für große Molekulargewichte ein nicht lineares Verhalten. Dies ließe sich vor allem durch den geringen Abstand zum Sammelgel erklären. Während der Elektrophorese kann sich die Grenzschicht durch Diffusion verbreitert und so die Ergebnisse verfälscht haben.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Banden des Proteins X nach der in Kapitel 5.4 beschriebenen Vorgehensweise integriert und anschließend linear gefittet. Bei diesem Prozess wurde angenommen, dass sich der Grauwert der Bande auf dem Foto linear zur Konzentration verhält. Die Intensität eines Spots hängt allerdings vom LAMBERT-BEERSchen Gesetz ab und ist somit logarithmisch. Auch nutzen Kameras typischerweise keine lineare Sensitivität. Trotzdem verhielten sich die ermittelten Werte linear (R-Wert von 99.5%) was einen Fit ermöglichte. Das Ergebnis ist also als deutlich Fehlerbehaftet einzustufen, sollte aber dennoch genauer als bloßes Schätzen sein. Bei der Auswertung des Gels wurde festgestellt, dass die Lauffront 1.12° von der Vertikalen abwich. Dies wurde allerdings bei der Auswertung berücksichtigt und sollte keine Fehlerursache darstellen.

6 Literatur

Literatur

1. Hoffmann, P. D. R. Praktikum Trennmethode (Zugegriffen am 20.07.2021), https://moodle2.uni-leipzig.de/pluginfile.php/2243875/mod_resource/content/1/Anleitung_Praktikum_2021.pdf.
2. Charles A Janeway Jr Paul Travers, M. W.; Shlomchik, M. J., *Immunobiology*, 5. Aufl., Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>; Garland Science: 2001.