

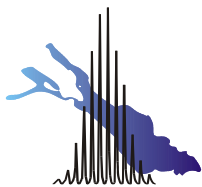
# **ANALYTISCHE CHEMIE I**

## **Trennmethoden**

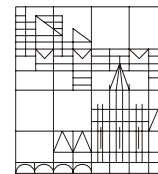
### **6. Elektrophorese-Methoden**

#### **Kapillarelektrophorese / Gelelektrophorese**

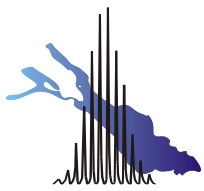
**WS 2007/2008**



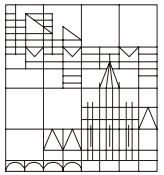
# Definition



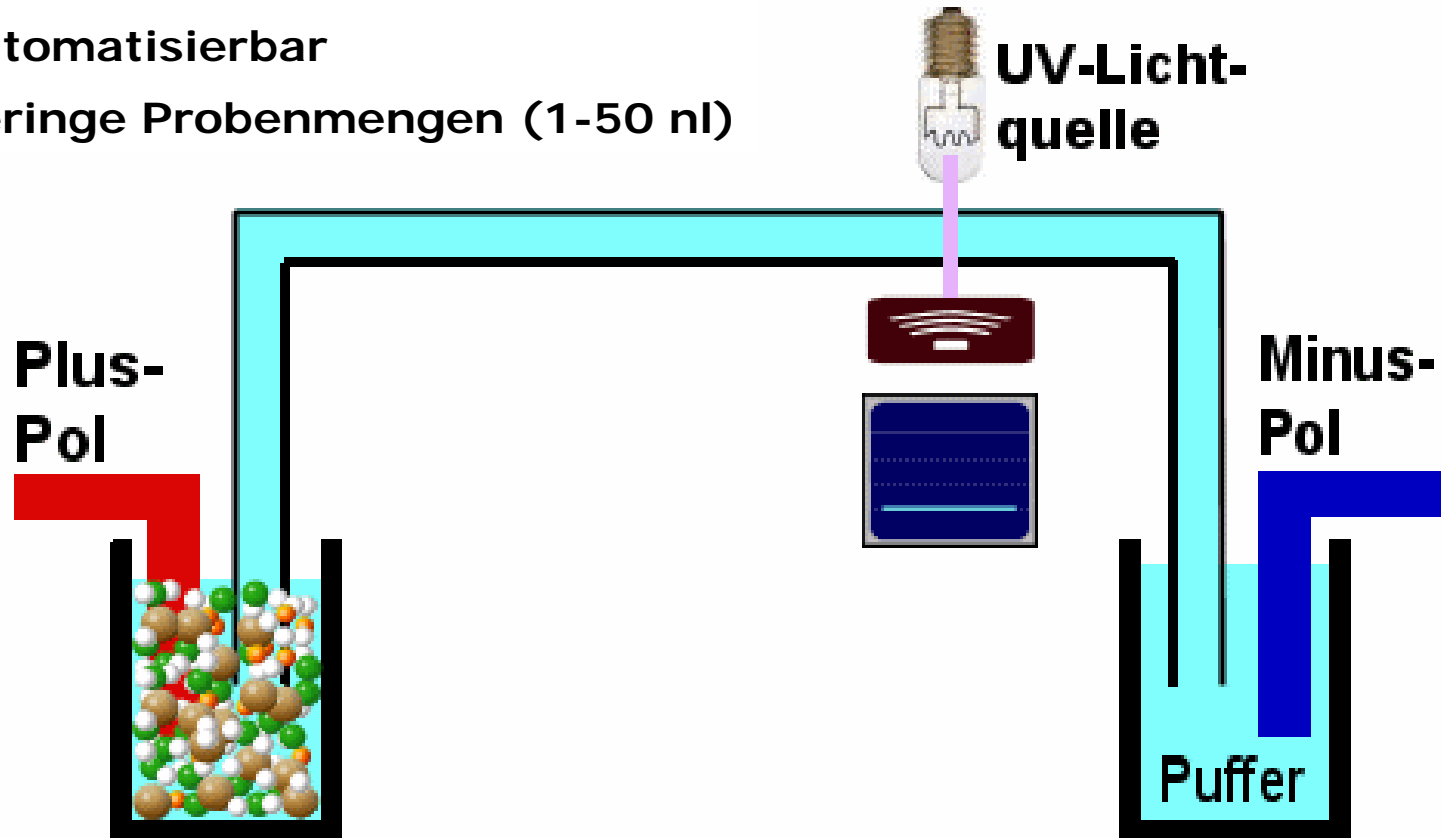
- **Elektrophorese** bezeichnet die Wanderung elektrisch geladener Teilchen durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff in einem elektrischen Feld
- Die Wanderungsgeschwindigkeiten verschiedener Ionen hängen von deren **Ladung, Form und effektiver Größe** sowie von der Lösungsumgebung und von der Stärke des elektrischen Feldes ab. Deshalb kommt es im Zuge einer elektrophoretischen Wanderung zur Trennung unterschiedlicher Ionen.
- Die Elektrophorese kann präparativ und vor allem analytisch genutzt werden



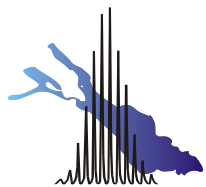
# Kapillarelektrophorese



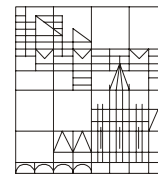
- Schnell (wenige Minuten)
- Automatisierbar
- Geringe Probenmengen (1-50 nl)



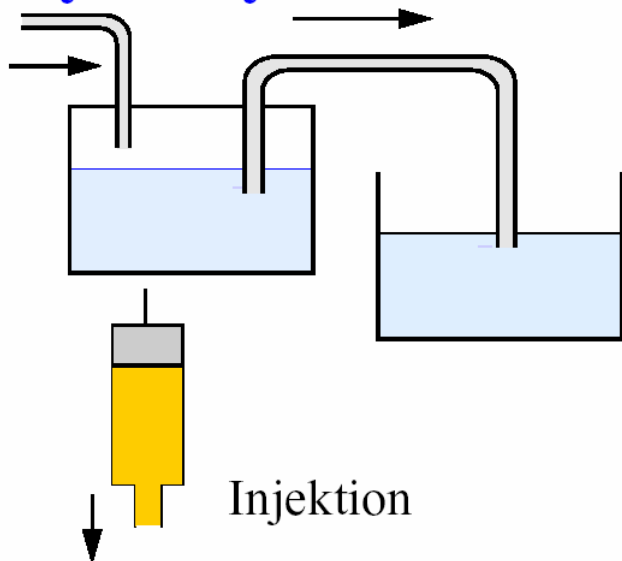
**1. Das Puffergefäß wird kurz gegen das Probengefäß ausgetauscht.**



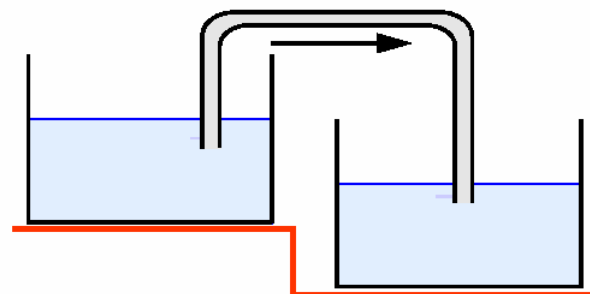
# Kapillarelektrophorese - Injektion



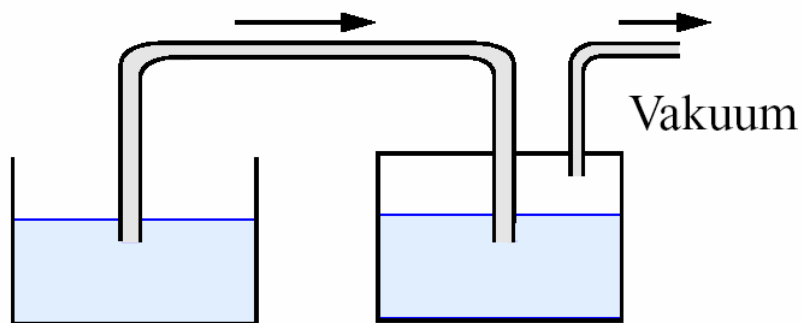
## 1. Hydrodynamisch



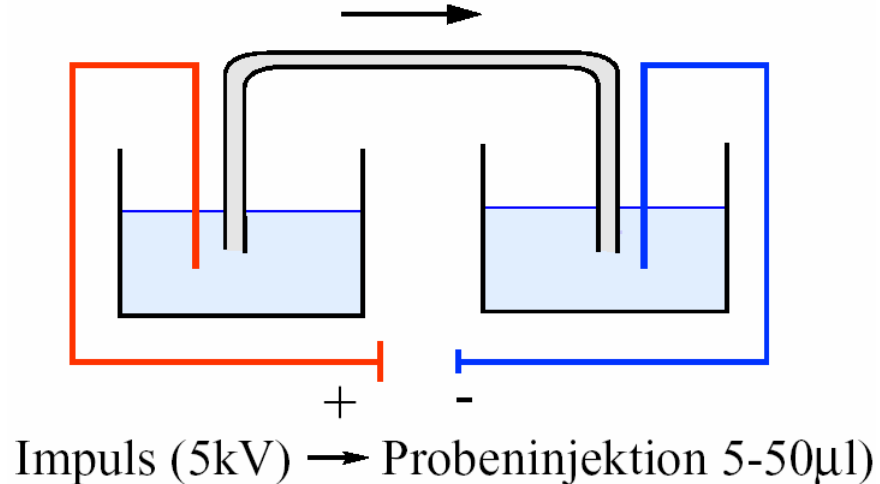
## 3. Siphon - Prinzip

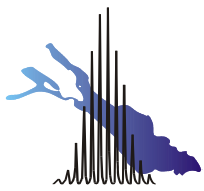


## 2. Vakuum

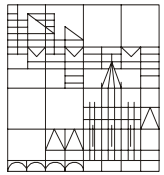


## 4. Elektrokinetisch

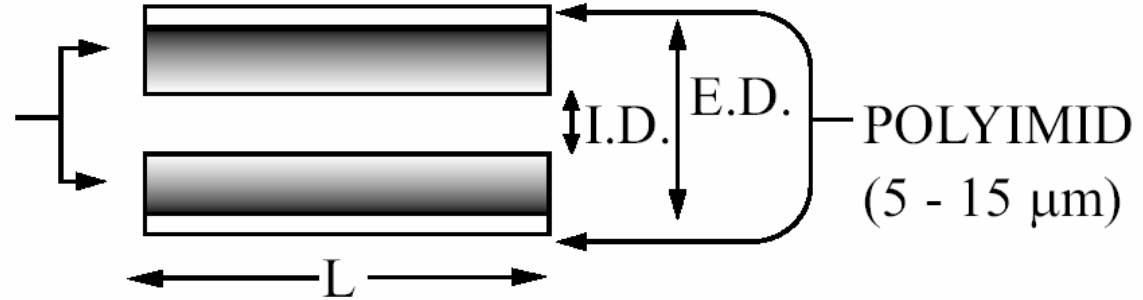
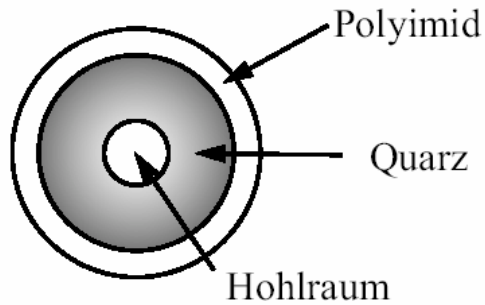




# Kapillarelektrophorese



## KAPILLARE



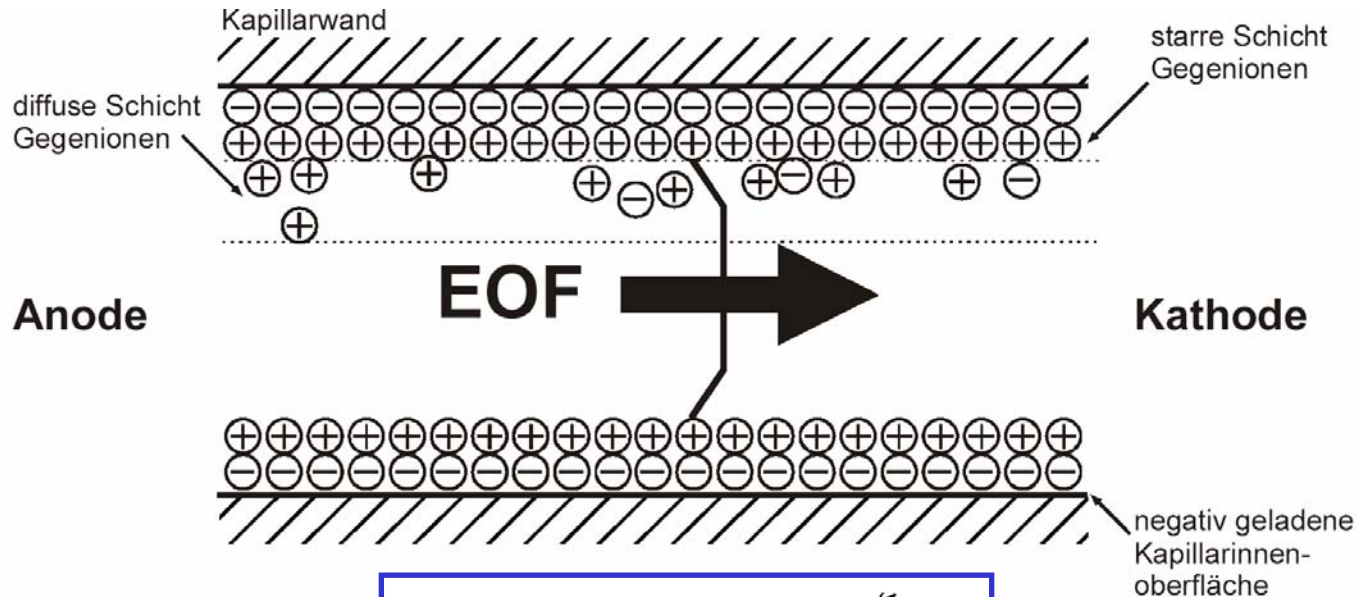
**Bodenzahl N 500000 - 1000000**

{ I.D. 25 - 100  $\mu\text{m}$   
E.D. 130 - 500  $\mu\text{m}$   
L 10 - 100 cm

1. Hochspannung bis zu 30 kV für bessere und schnellere Trennung
2. kleine Durchmesser für eine gute Wärmeabstrahlung
3. Thermostatisierung der Kapillare zum Konstanthalten der Wanderungsgeschwindigkeiten

# Der elektroosmotische Fluss (EOF)

Durch Wechselwirkung zwischen Puffer und Oberfläche des Trägermaterials sind im Puffer Wolken von frei beweglichen positiven Ladungen. Diese bewegen sich beim Anlegen der Spannung in Richtung Minus-Pol.



$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot F = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot F$$

F: elektrische Feldstärke

$v_{eo}$ : elektroosmotische Geschwindigkeit

$\epsilon_0$ : absolute Dielektrizitätskonstante

$\epsilon_r$ : relative Dielektrizitätskonstante

$\eta$ : dynamische Viskosität des Puffers

$\mu_{eo}$ : elektroosmotische Mobilität

$\zeta$ : Zeta-Potential

# Kapillaronenelektrophorese (CZE)

Kationen

Anionen

Neutalmoleküle

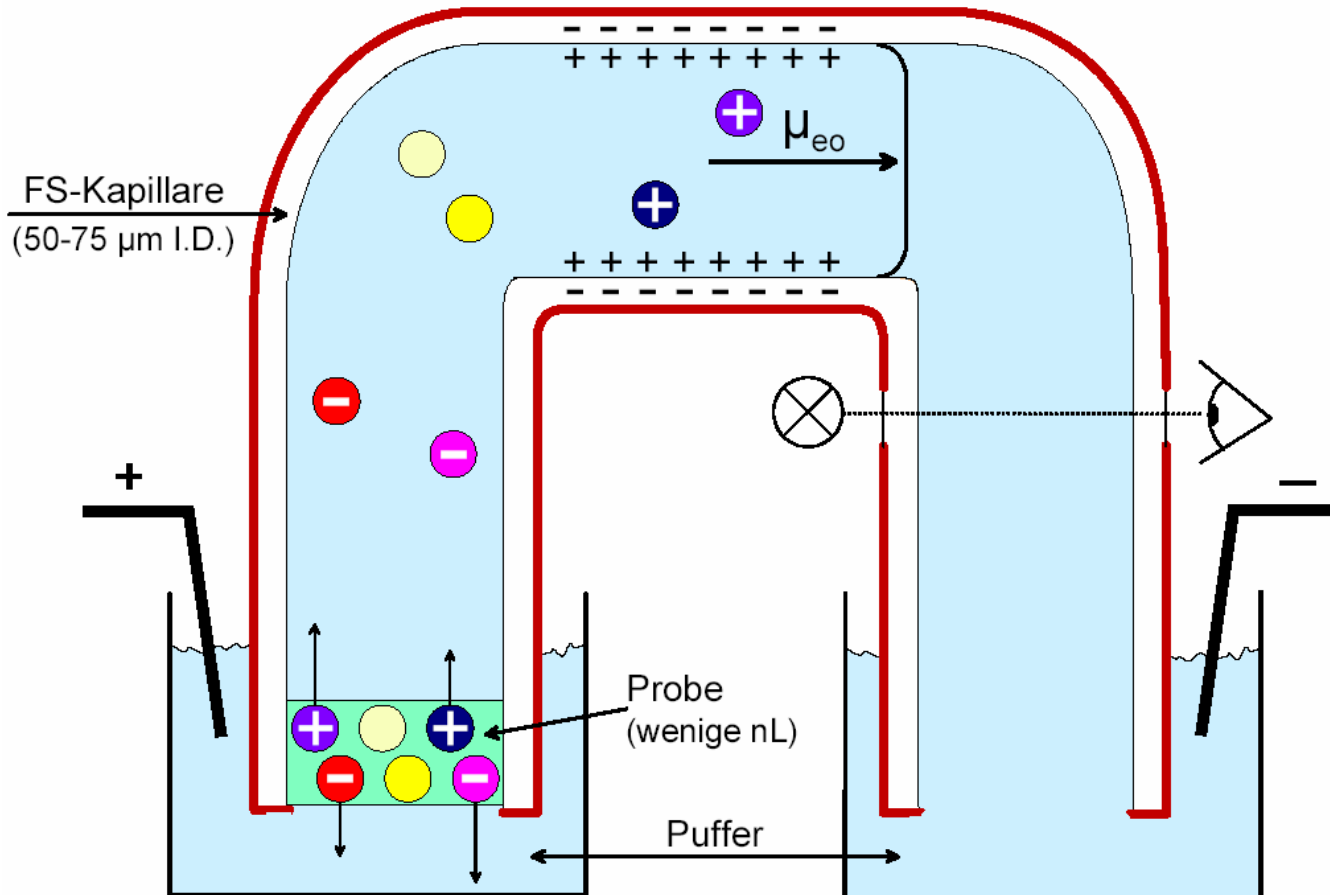
$$\mu_{\text{res}} = \mu_{\text{eo}} + \mu_{\text{ep}}$$

$$\mu_{\text{res}} = \mu_{\text{eo}} - \mu_{\text{ep}}$$

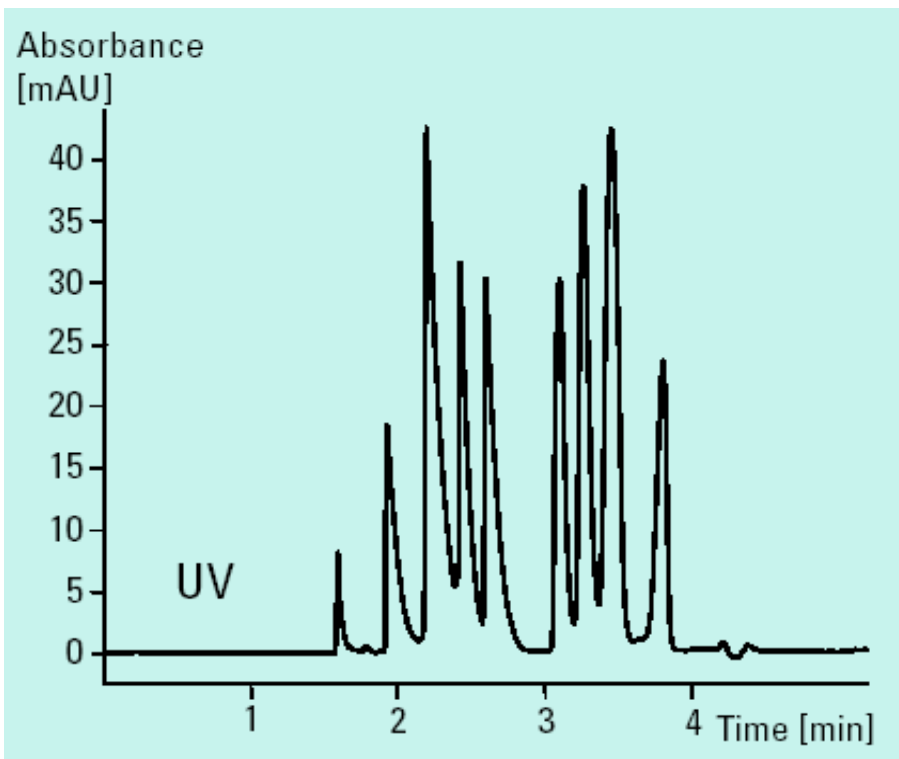
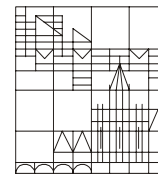
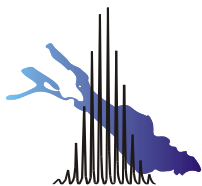
$$\mu_{\text{res}} = \mu_{\text{eo}}$$

$\mu_{\text{eo}}$ : elektroosmotische  
Mobilität

$\mu_{\text{ep}}$ : elektrophoretische  
Mobilität

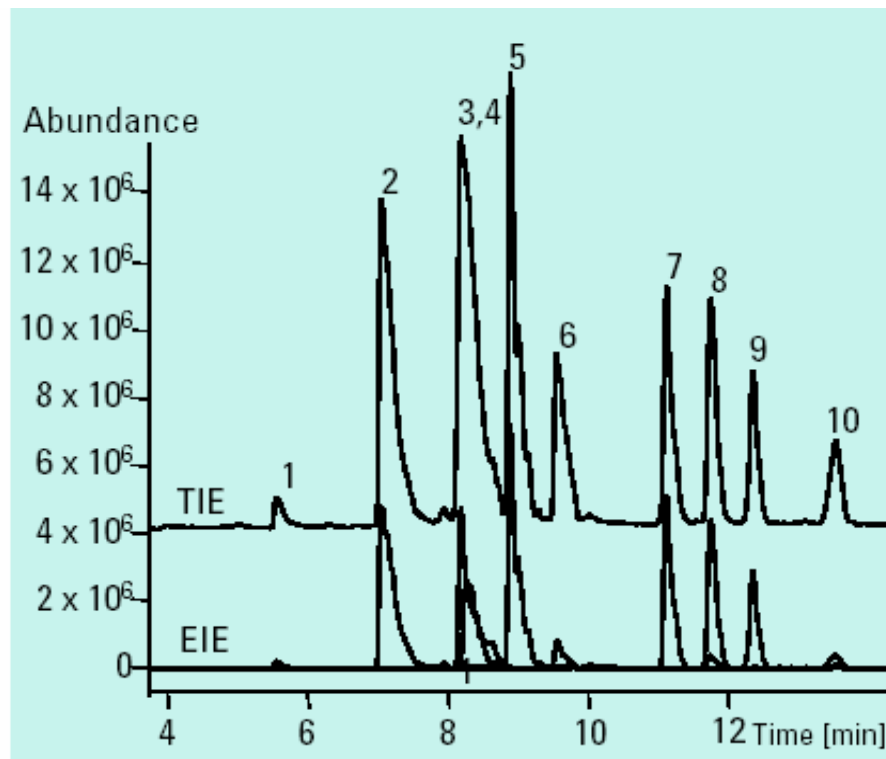


# Kapillarzonenelektrophorese (CZE)



## Conditions CE

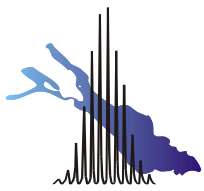
**Sample:** 10 synthetic peptides, 0.16 mg/ml each  
**Injection:** 150 mbar\*s  
**Capillary:** 75cm (22cm) x 50µm I.d.  
**Buffer:** 20 mM phosphate pH 2.5 or 10 mM acetic acid pH 3.5  
**Voltage:** 27 kV  
**Temperature:** 25°C  
**UV-Detection:** Signal 206/10 nm, Reference 450/80nm



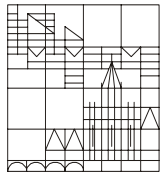
## Conditions MS

**Sheath liquid:** 0.5% acetic acid in 50% methanol, 4µl/min  
**Nebulizing gas:** nitrogen, 10psi  
**Drying Gas:** nitrogen, 10 l/min, 150°C  
**Acquisition:** positive mode, Vcap- 4kV, Fragmentor 96 V  
**Scan range:** m/z 350-650

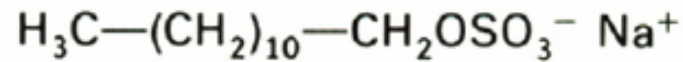




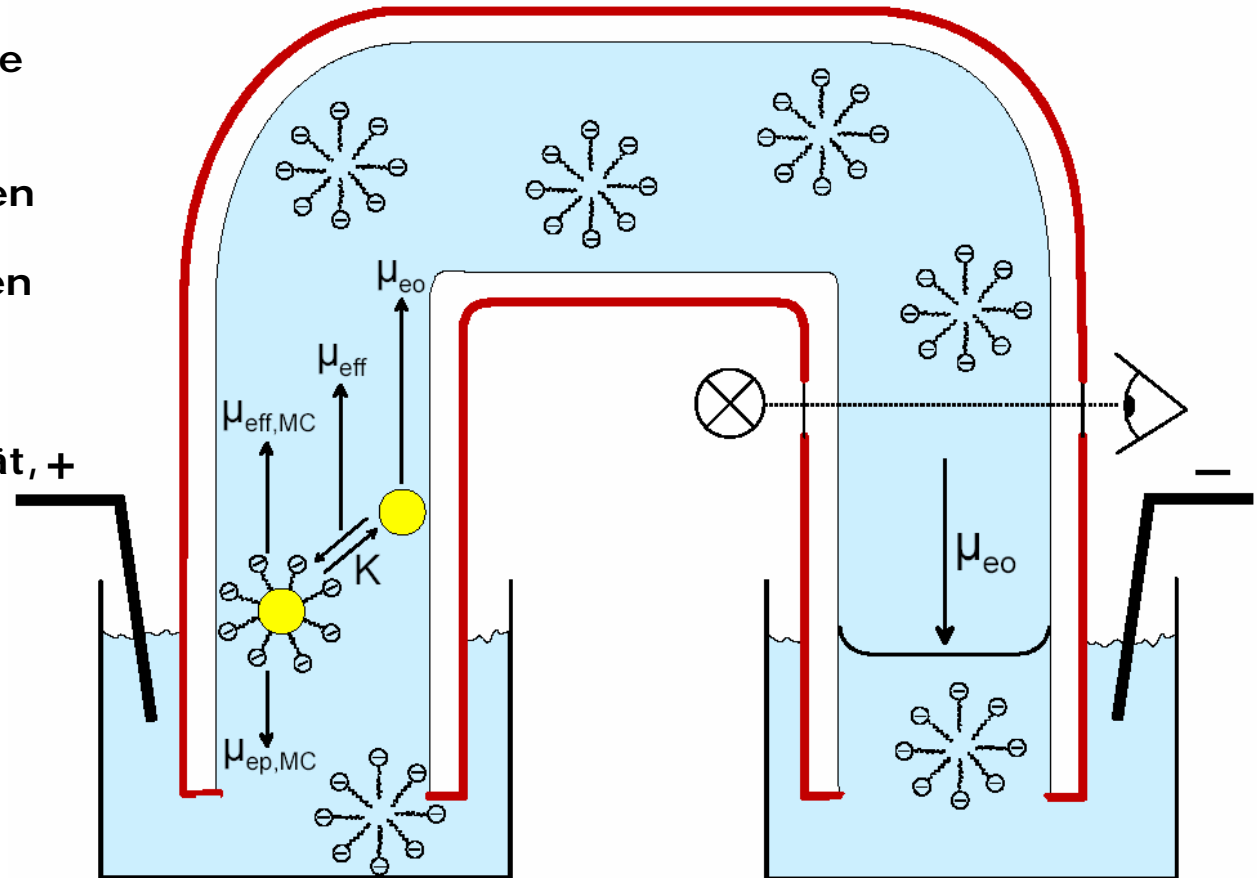
# Micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

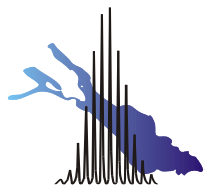


## Natriumdodecylsulfat (SDS)

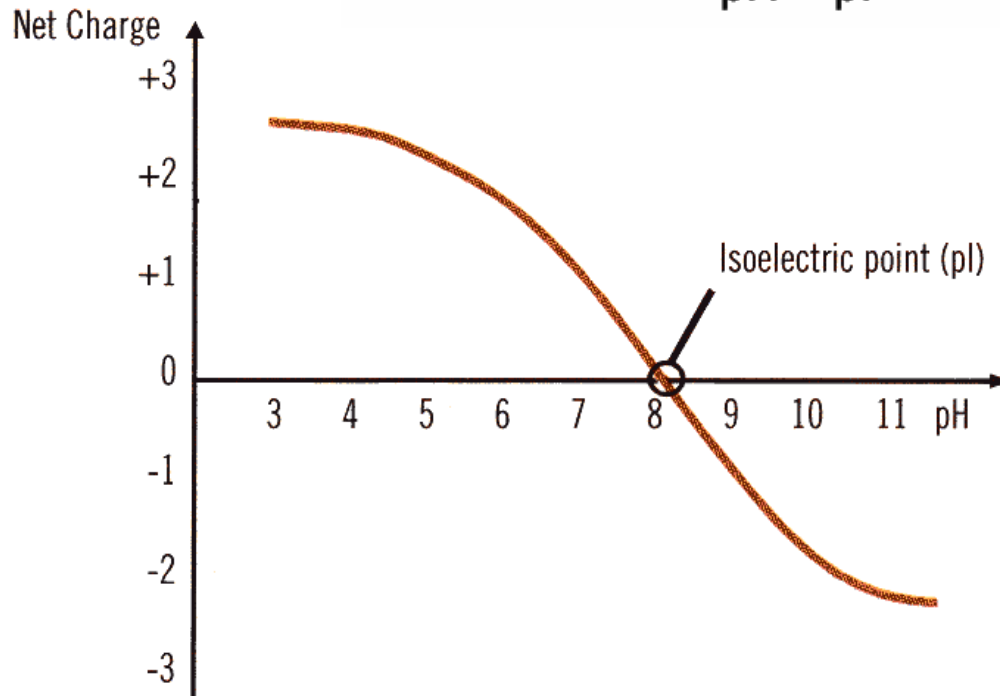
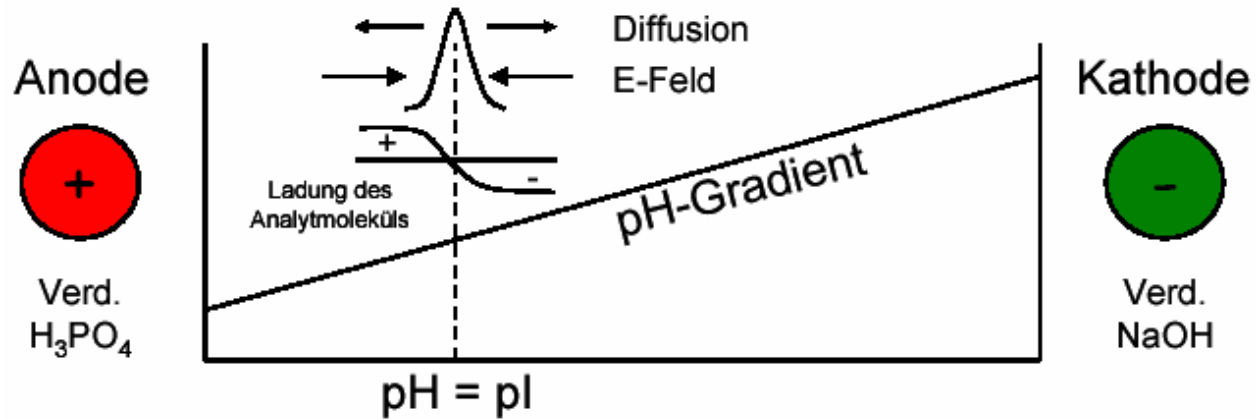
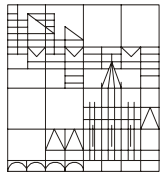


Oberflächenaktive Substanzen bilden in der Lösung (mobile Phase) Micellen (pseudostationäre Phase), worin dann die ungeladenen und hydrophoben Komponenten eingeschlossen werden. Die Micellen stehen mit den Monomeren im Gleichgewicht. Die Trennung erfolgt nach steigender Hydrophobizität, +

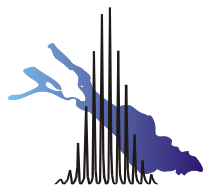




# Kapillarelektrophorese Isoelektrische Fokussierung (IEF)

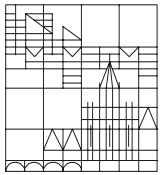


Die Moleküle werden entsprechend ihrer elektrischen Ladung aufgetrennt. In einem pH-Gradienten bewegen sich die Moleküle so lange vorwärts, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreichen. Bis sie also an dem pH-Wert gelangen, an dem ihre Ladung gleich Null ist.

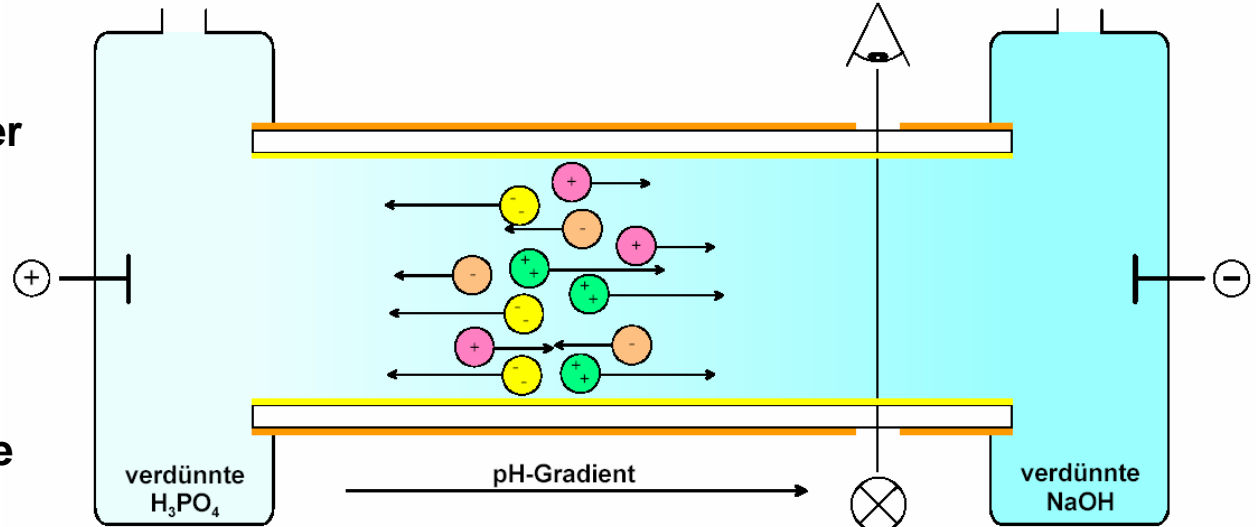


# Kapillarelektrophorese

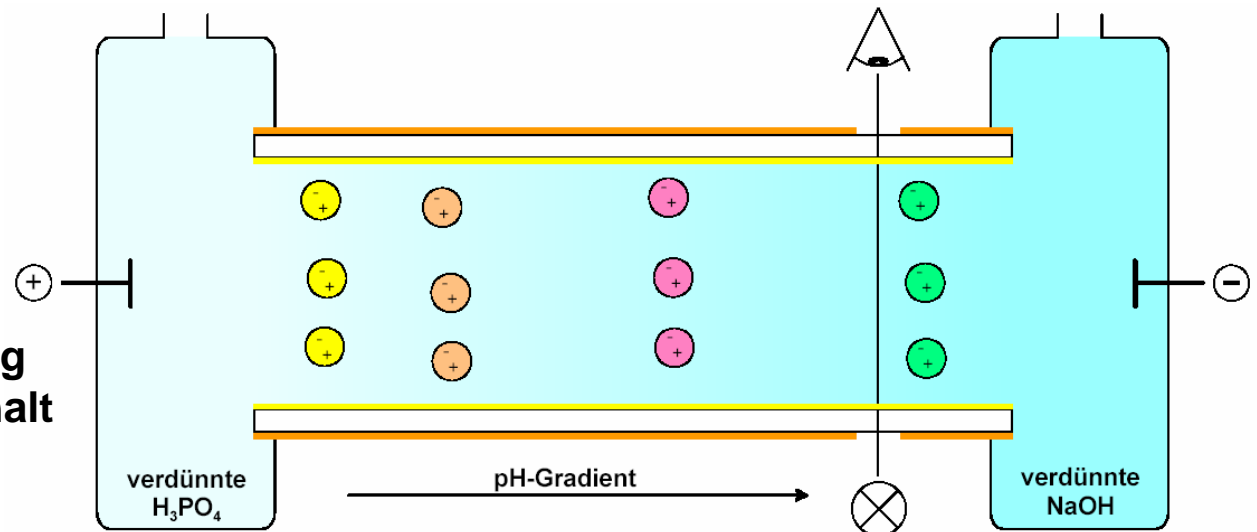
## Isoelektrische Fokussierung (IEF)



Der pH-Gradient wird durch ein spezielles Gemisch synthetischer Ampholyte erzeugt

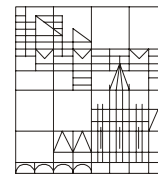
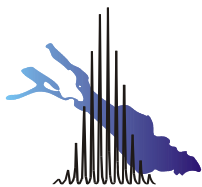


Der elektroosmotische Fluss muss unterdrückt bzw. verhindert werden



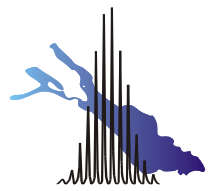
Am Ende der Trennung wird der Kapillareninhalt durch Druck aus der Kapillare befördert

# Nachweisgrenzen einiger Detektionsmethoden in der CE

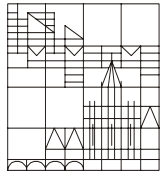


Methode	Nachweisgrenze	
	absolut [mol]	relativ <sup>*)</sup> [mol/l]
UV-Absorption	$10^{-13} - 10^{-16}$	$10^{-5} - 10^{-8}$
Fluoreszenz	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$
Laser-induzierte Fluoreszenz	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-10} - 10^{-12}$
Amperometrie	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$
Leitfähigkeit	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$
Massenspektrometrie	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$

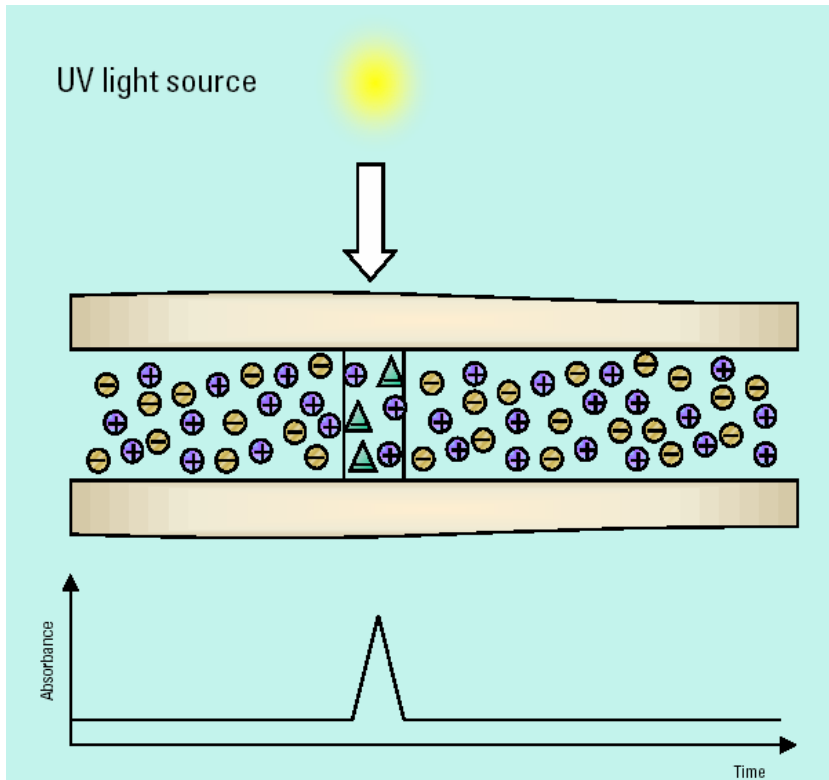
<sup>\*)</sup> bezogen auf ein Injektionsvolumen von 10 nl



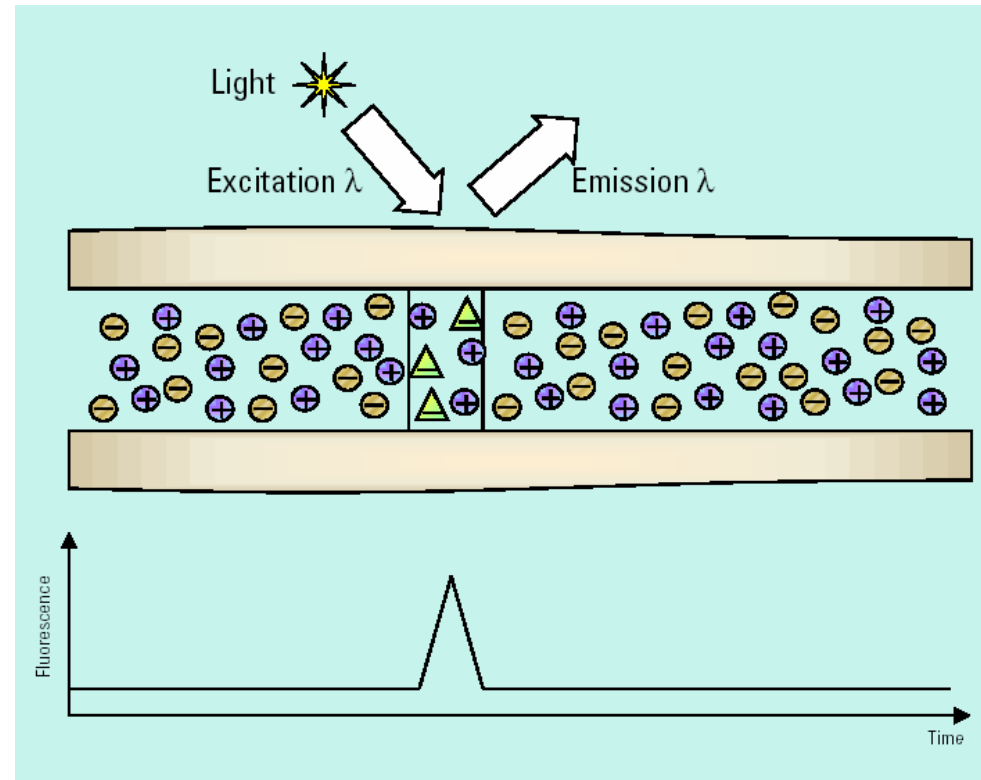
# Kapillarelektrophorese - Detektion

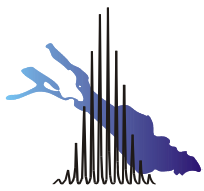


UV

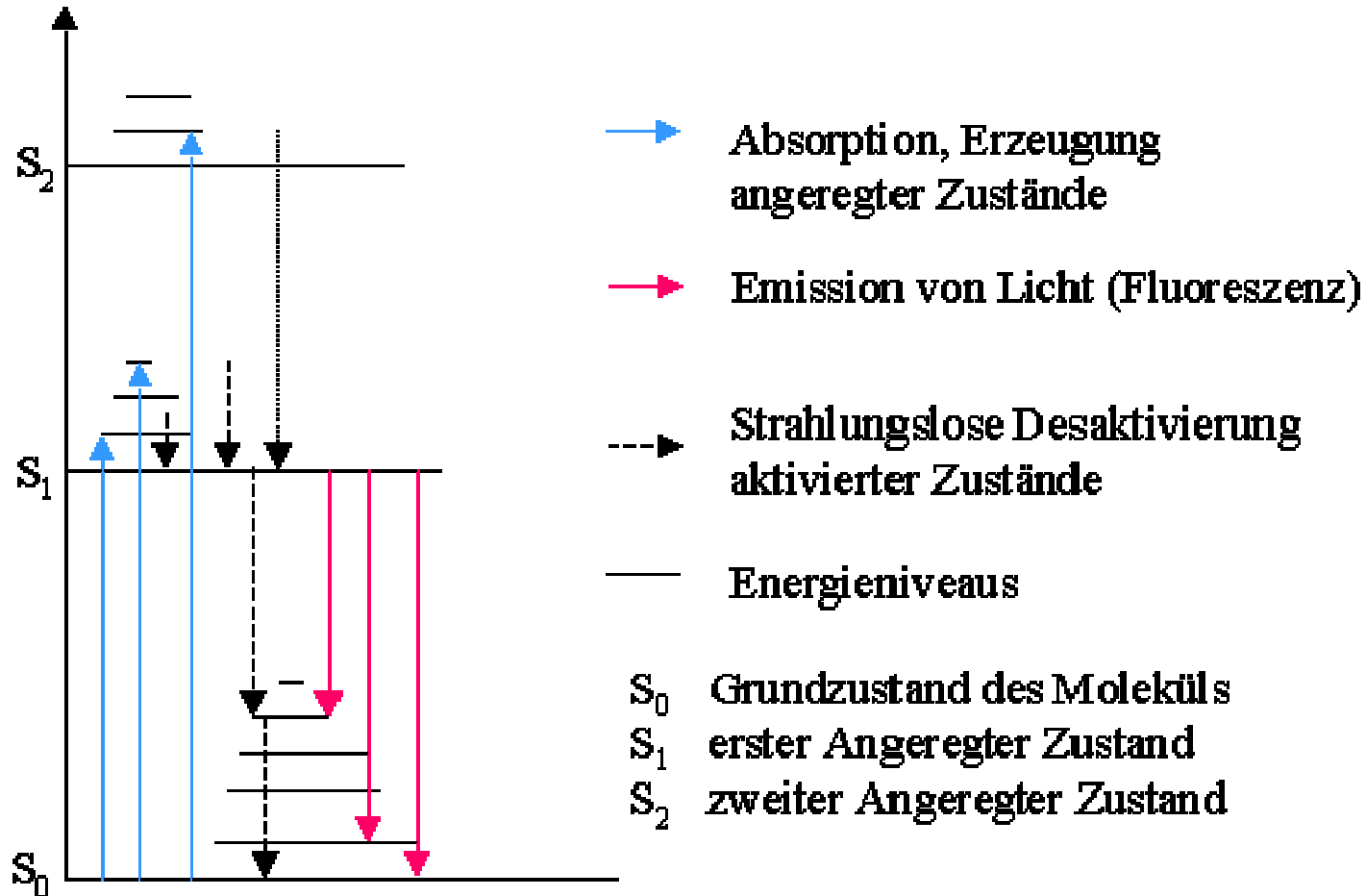
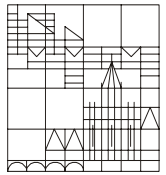


Fluoreszenz

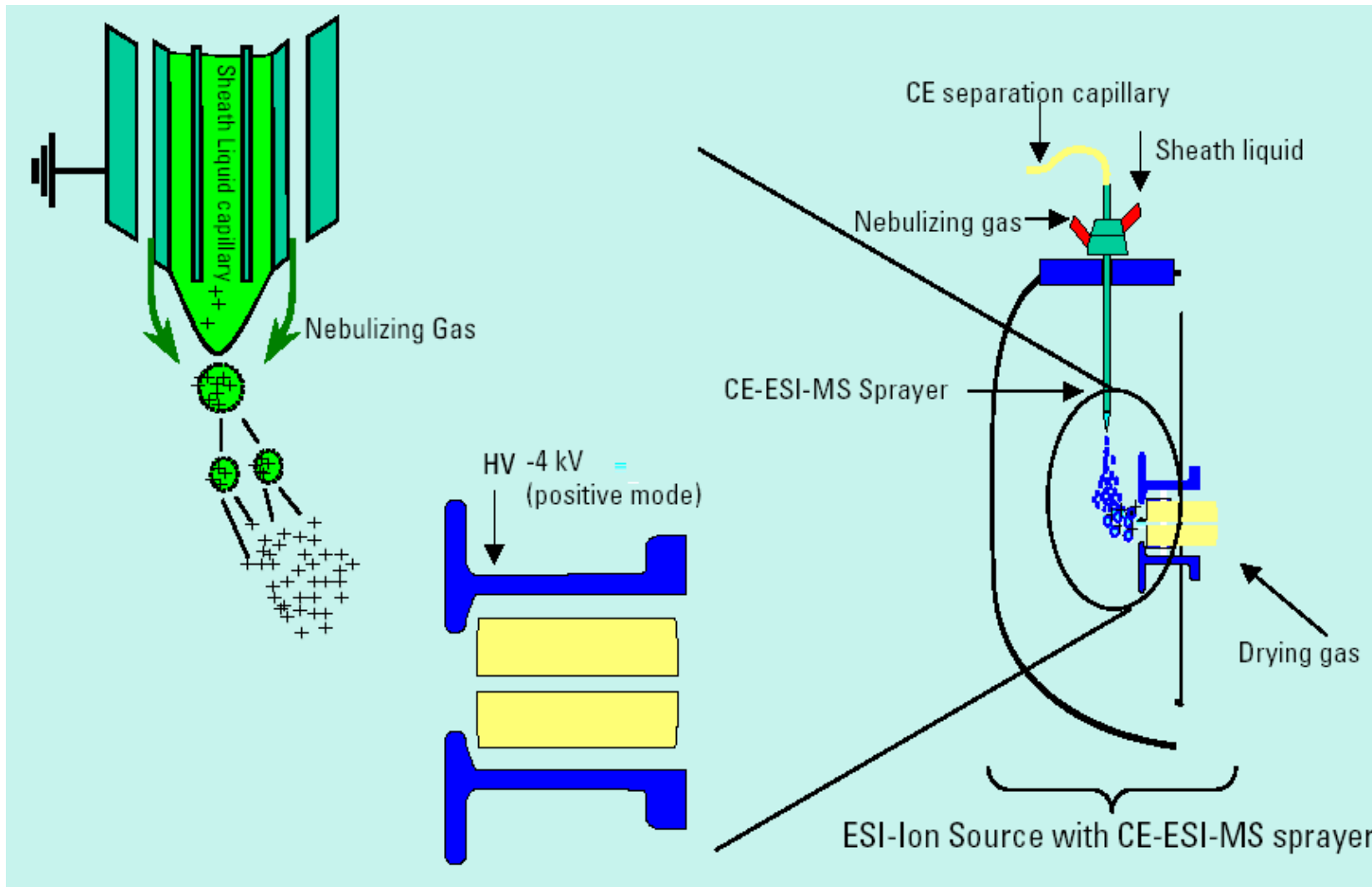
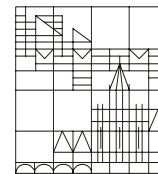
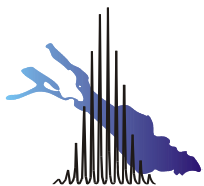




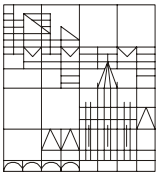
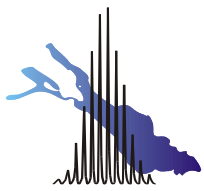
# Fluoreszenz - Detektion



# Kapillarelektrophorese - CE-MS



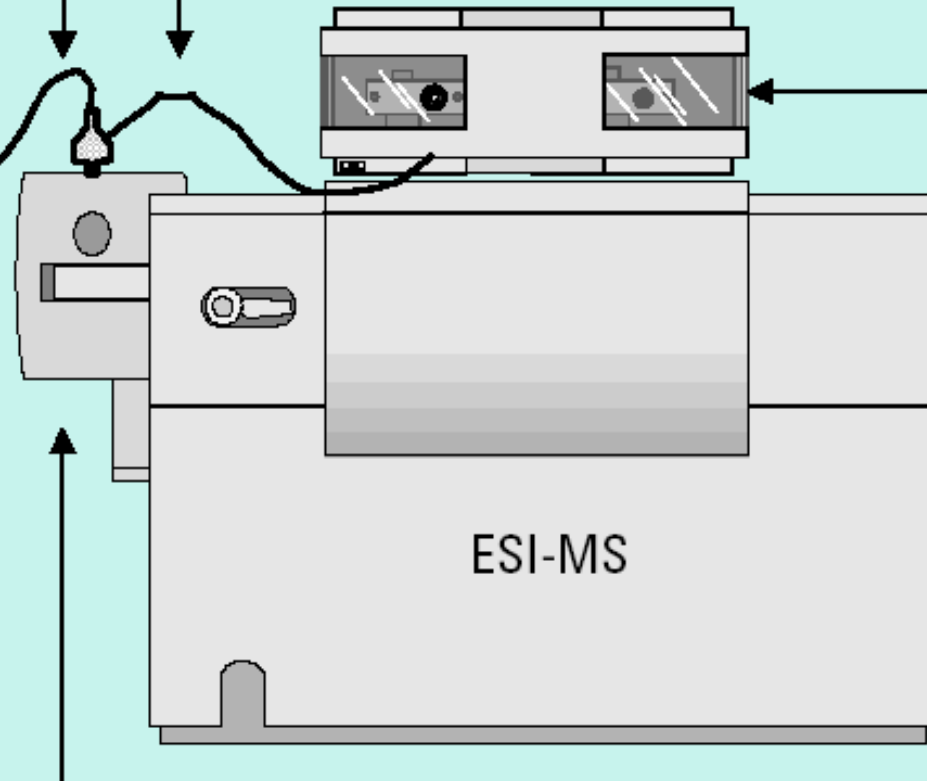
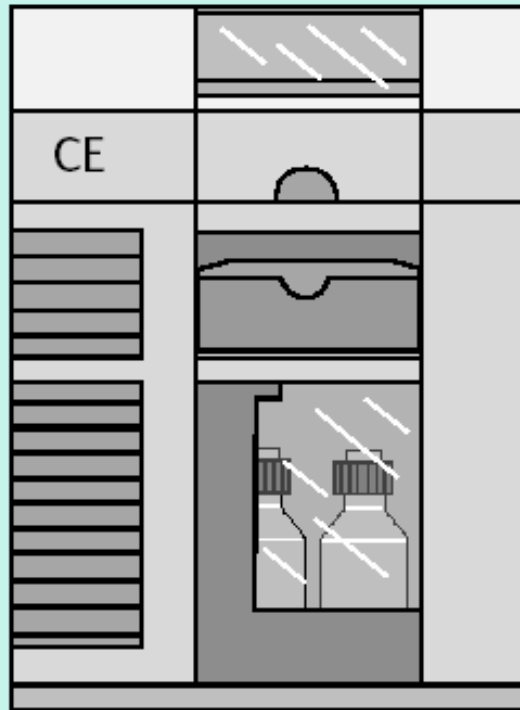
# Kapillarelektrophorese - CE-MS



CE Separation Capillary

Sheath Liquid Line

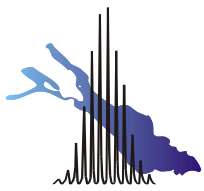
Sheath Liquid Pump



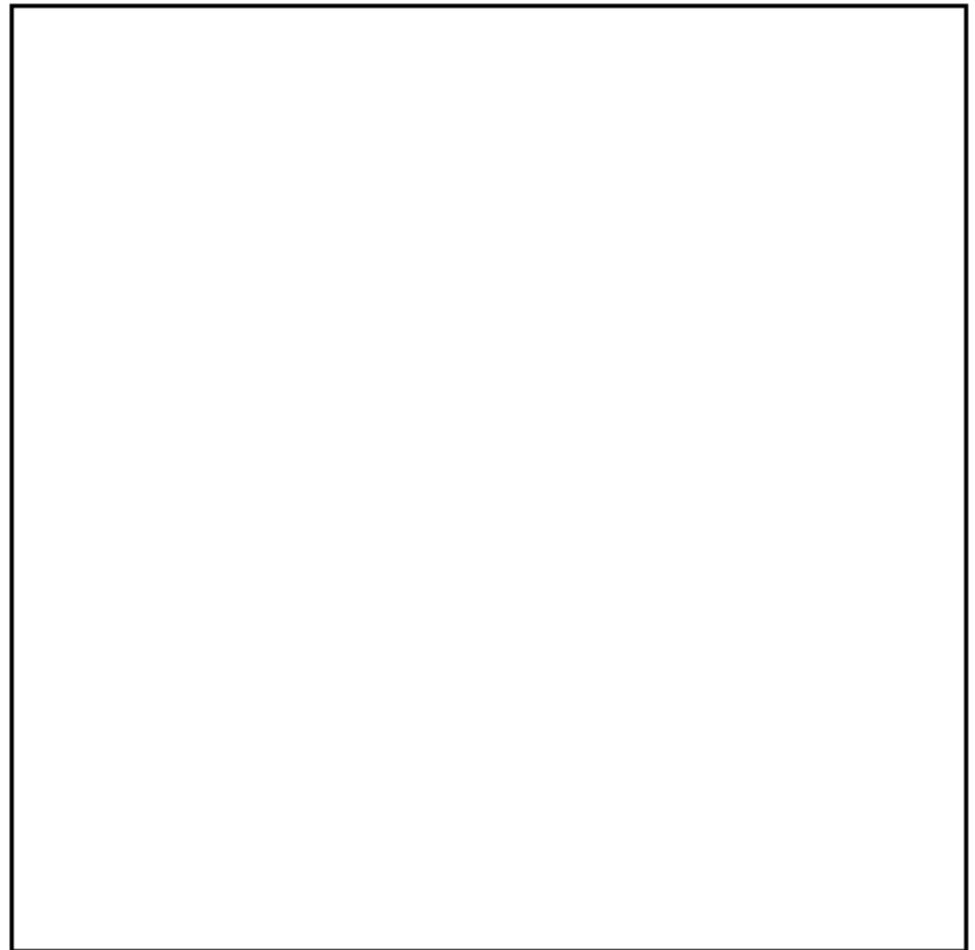
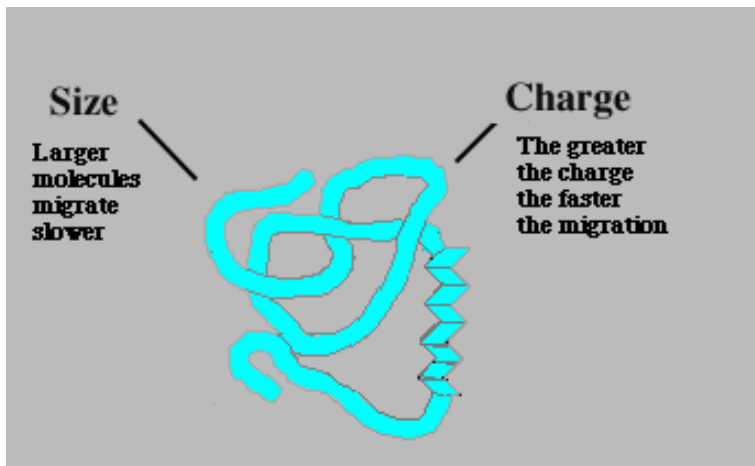
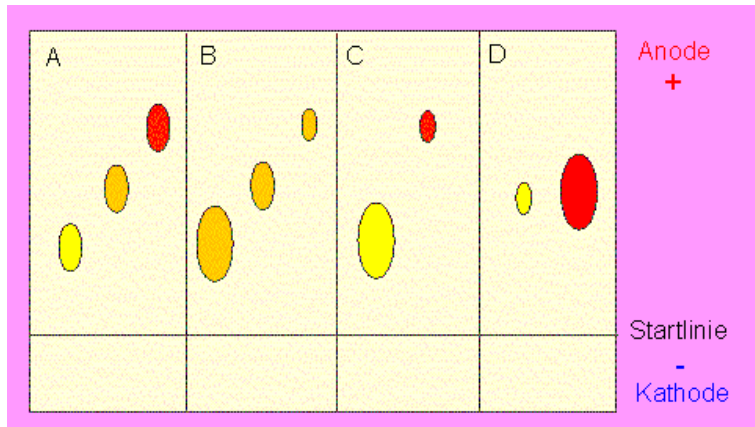
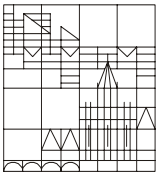
ESI-MS

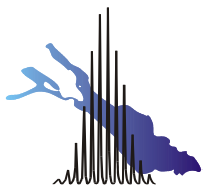
ESI Ion Source with CE-ESI-MS Sprayer



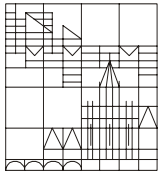


# Gelelektrophorese





# Gelelektrophorese - Färbemethoden



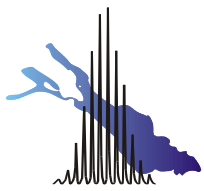
## Coomassie-Blau

- Bindet unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten des Proteins.
- Die Nachweisgrenze beträgt 100 - 50 ng.
- Proteine können durch Vergleich mit einem Standard quantifiziert werden.

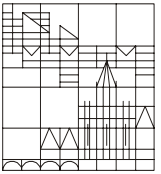
## Silberfärbung

- Dabei bilden  $\text{Ag}^+$  Ionen Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinreste. Durch Reduktion entsteht elementares Silber, welches die Proteine sichtbar macht.
- Die Nachweisgrenze liegt bei 5 ng.
- Da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität angefärbt werden, ist die Silberfärbung nicht zur Quantifizierung von Proteinen geeignet.
- Bei der Silberfärbung werden außerdem Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide und Glykolipide angefärbt.

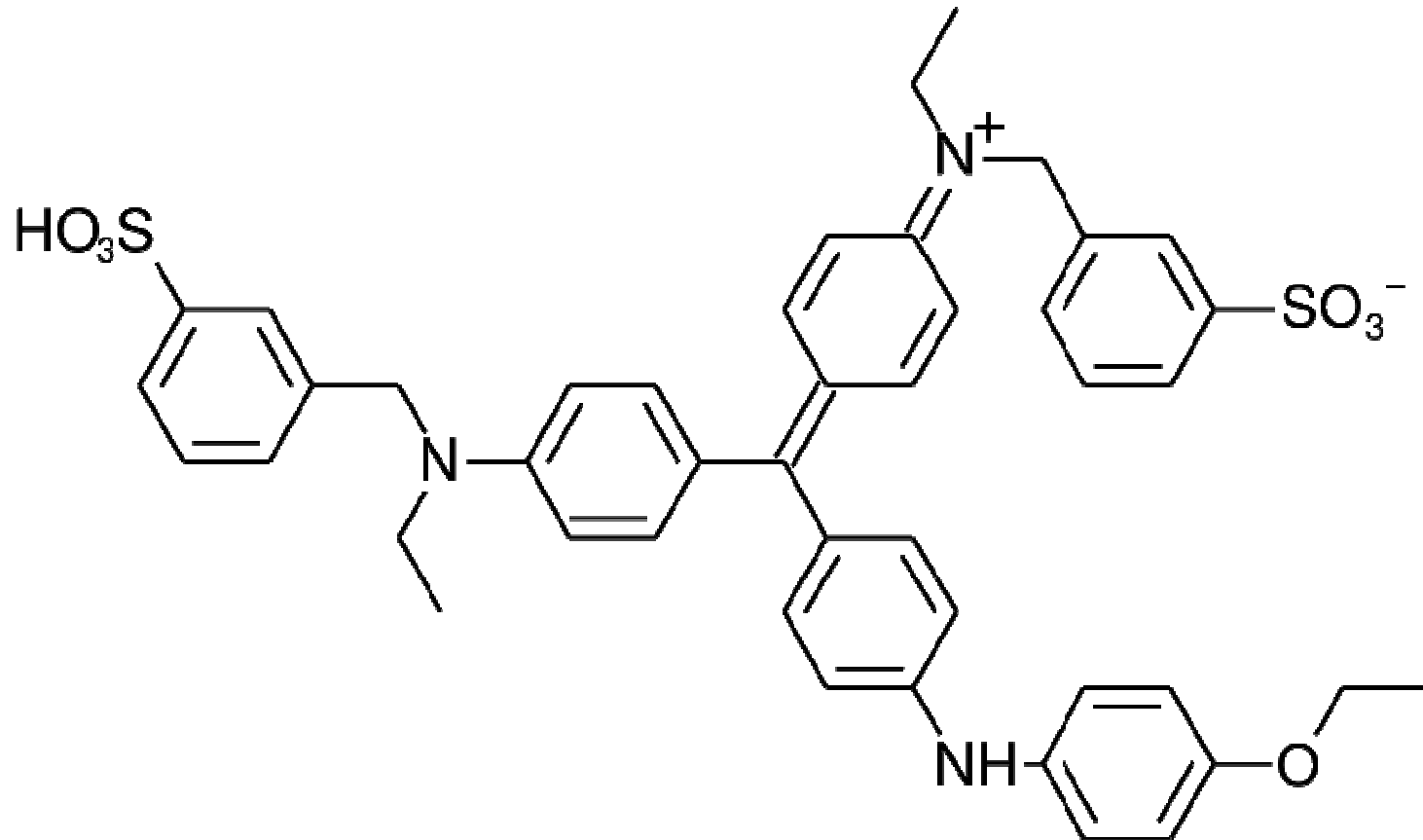
## Fluoreszenzfarbstoffen-Markierung

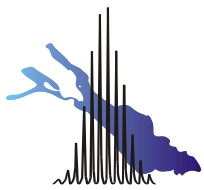


# Gelelektrophorese - Färbemethoden

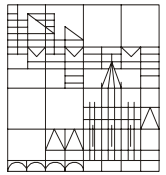


## Coomassie Brilliant Blue R-250

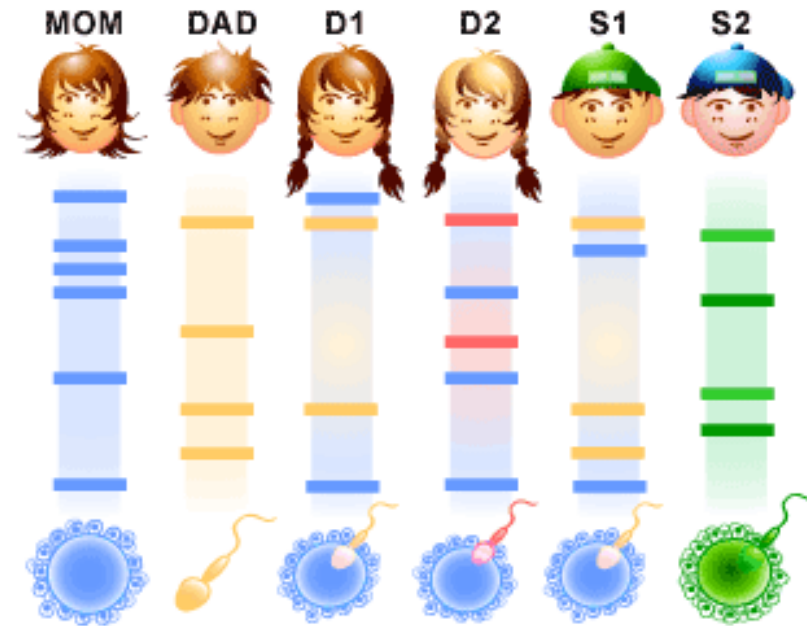
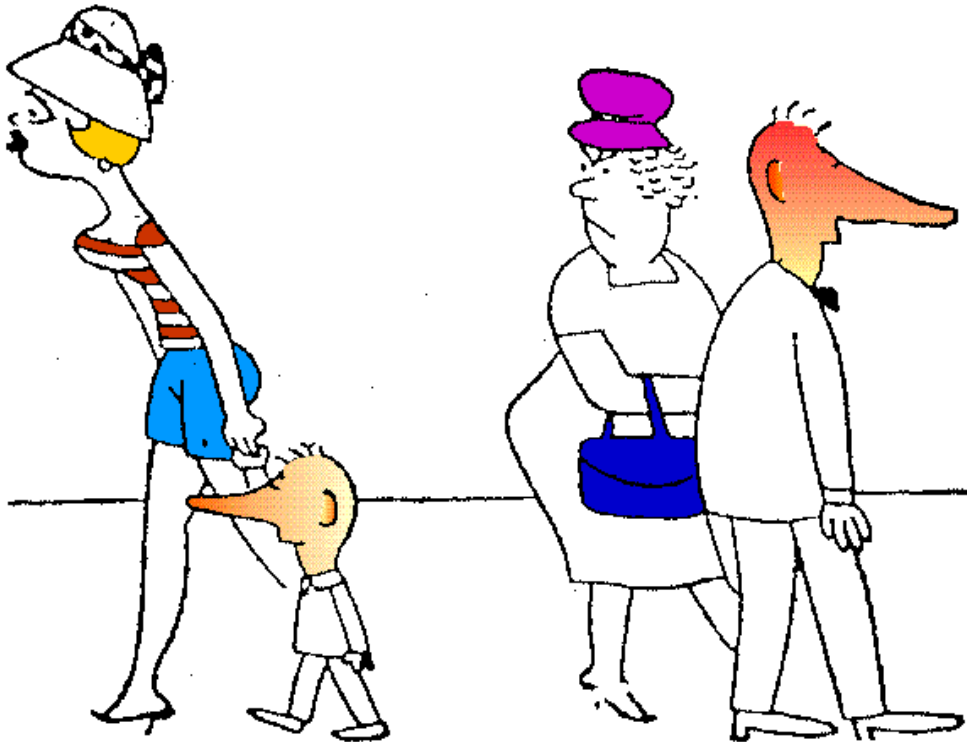




# Vaterschaften



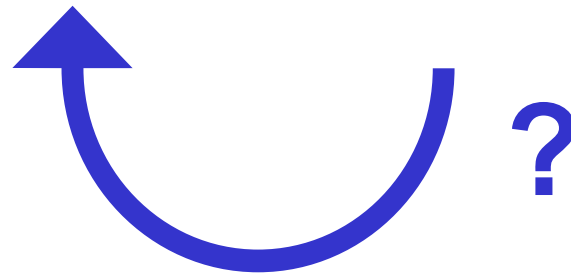
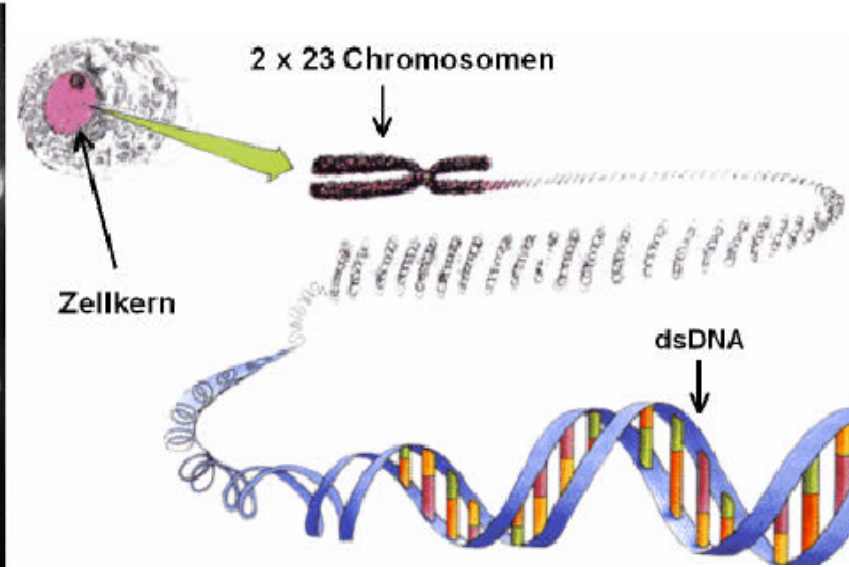
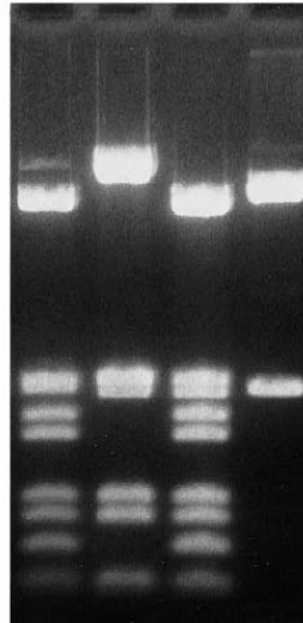
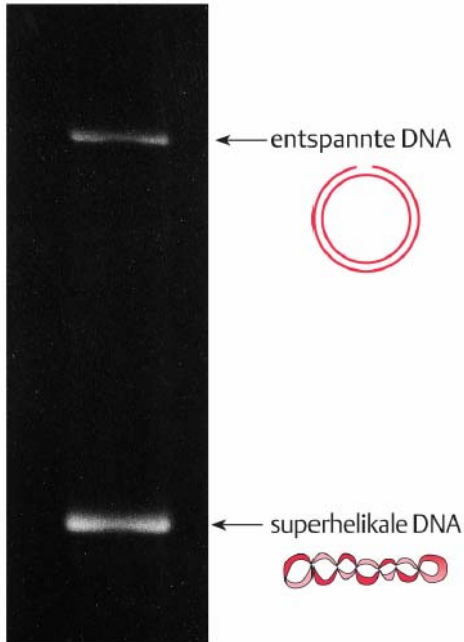
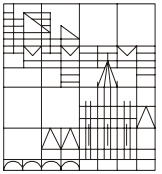
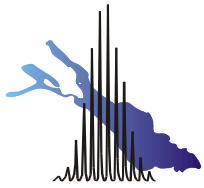
1. hohe Nachweisempfindlichkeit
2. exakt und reproduzierbar
3. vergleichbar (Datenbanken)
4. individualspezifisch
5. hoher Beweiswert



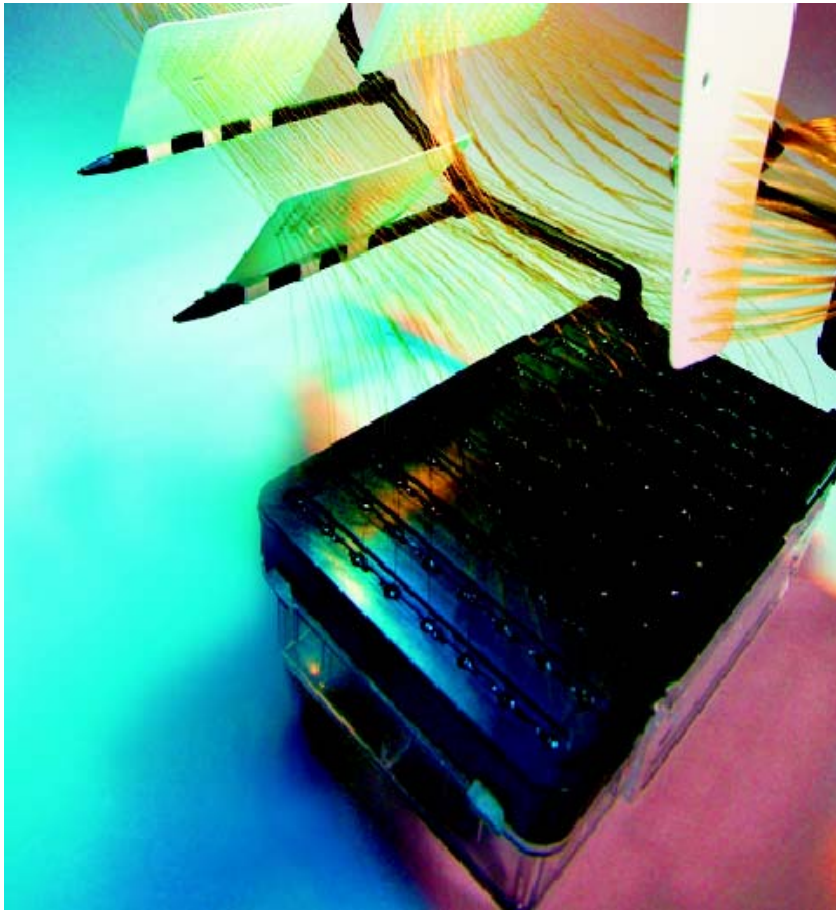
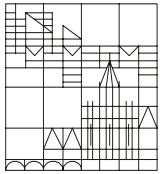
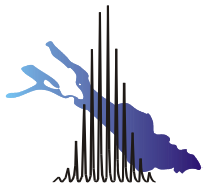
Wahrscheinlichkeit  
einen Nicht-Vater als  
solchen zu erkennen

**A > 99.99%**

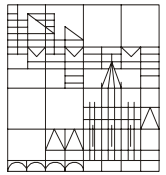
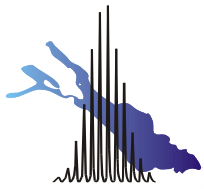
# Trennung von DNA (Agarose-Gelelektrophorese)



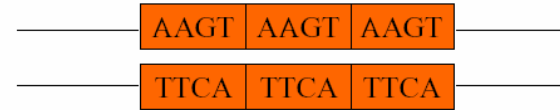
# DNA Sequenzierung - Frederick Sanger (1977)



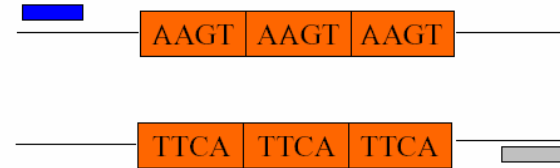
# Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)



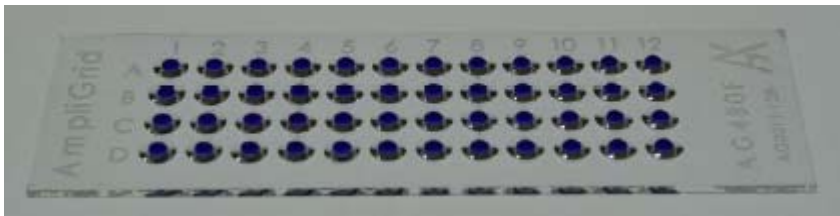
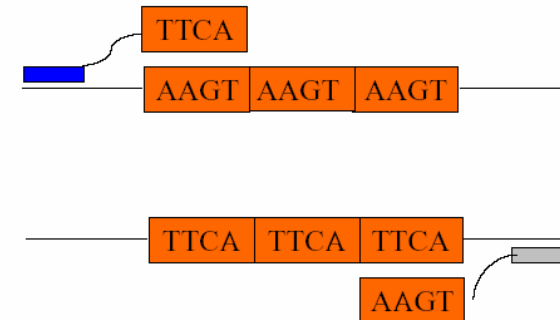
➔ Thermische Denaturierung



➔ Annealing der Primer



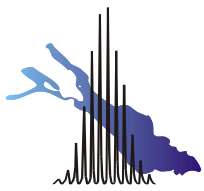
➔ Elongation durch  
Taq-Polymerase



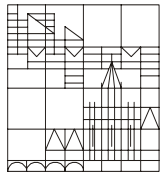
PCR in 1 µl Reaktionsvolumen

Mittels der PCR können begrenzte Bereiche sensitiv und spezifisch innerhalb weniger Stunden in einem thermozyklischen Prozeß millionenfach vervielfältigt (amplifiziert) werden.

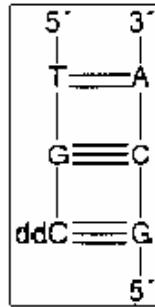




# Polymerasekettenreaktion



Sequenzierungsprimer ist nur zu einer einzigen Stelle der Matrize komplementär



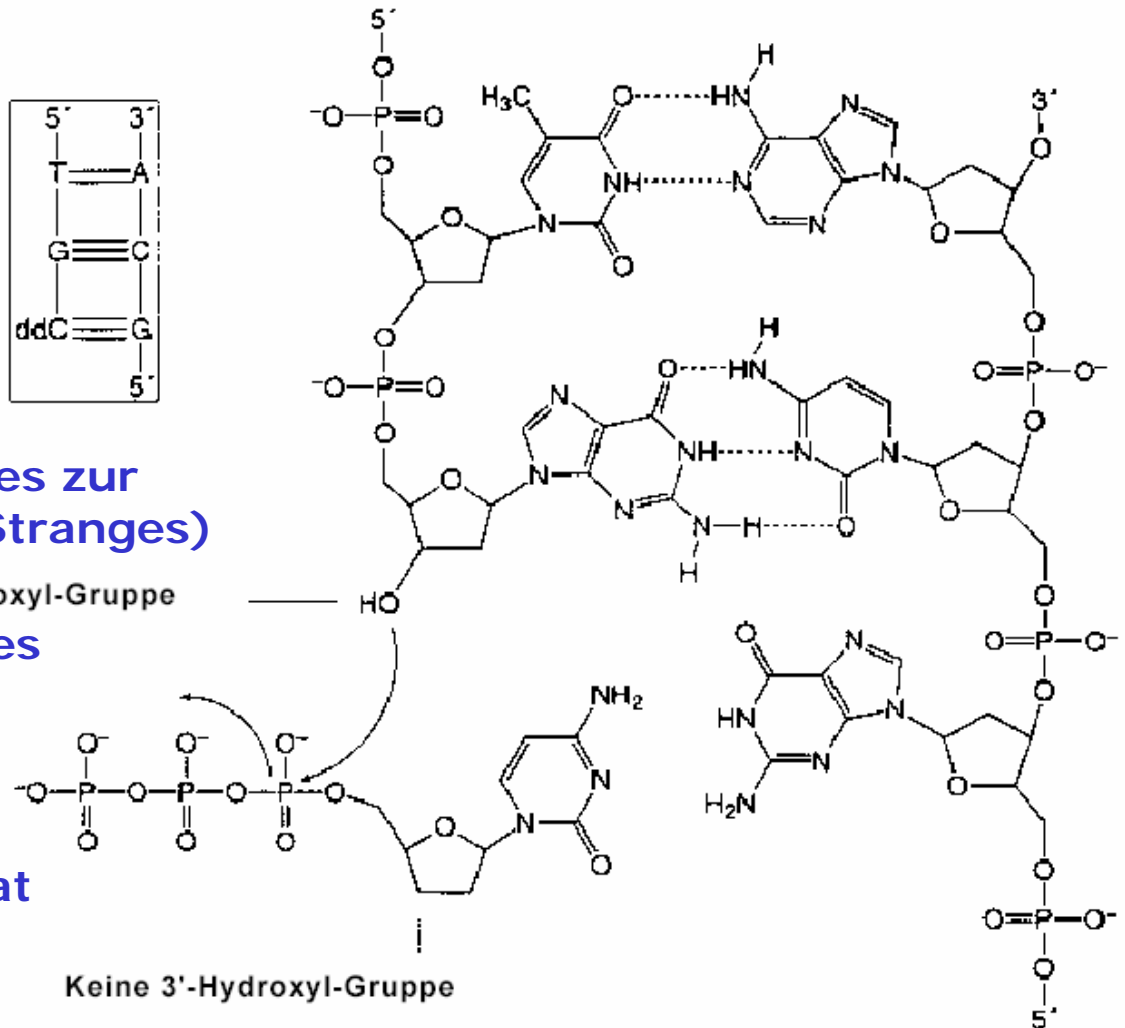
T7-DNA-Polymerase (enzymatische Synthese des zur Matrize komplementären Stranges)

Deoxynucleosidtriphosphates (Kettenwachstum)

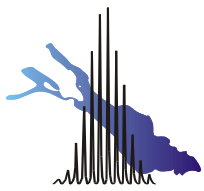
Dideoxynucleosidtriphosphat (Kettenabbruch)

Reaktionsprodukts

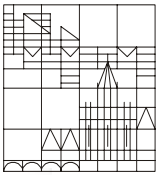
Matrizen-DNA







# Vaterschaftstest



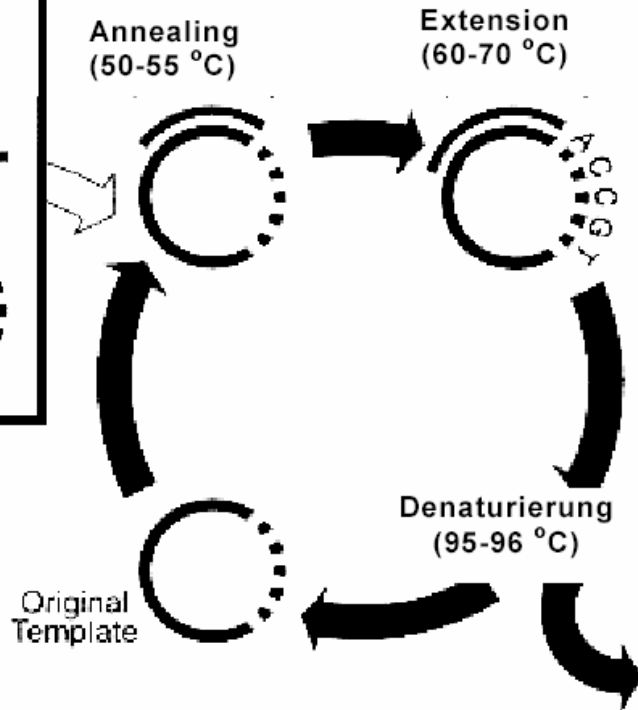
1. DNA Isolierung
2. PCR
3. Elektrophorese
4. Biostatistische Auswertung

**Reaktionsmischung**

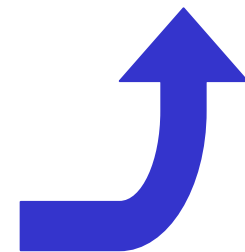
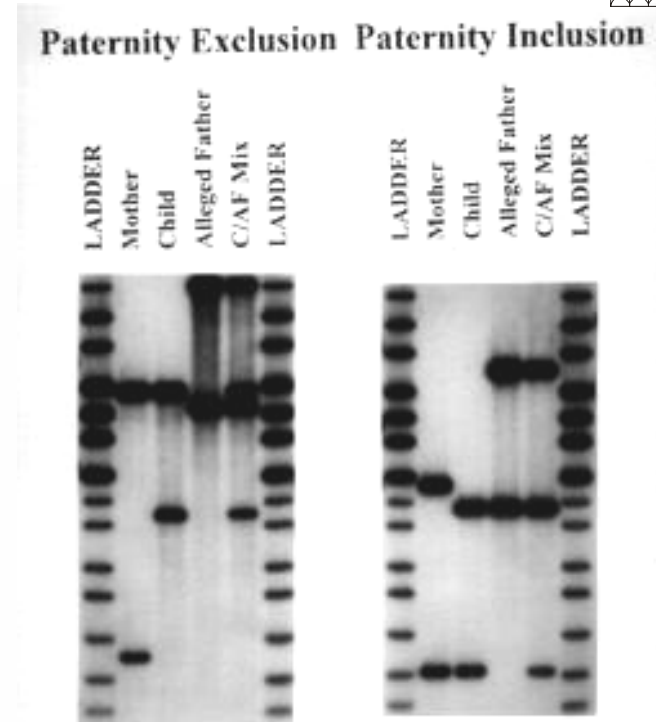
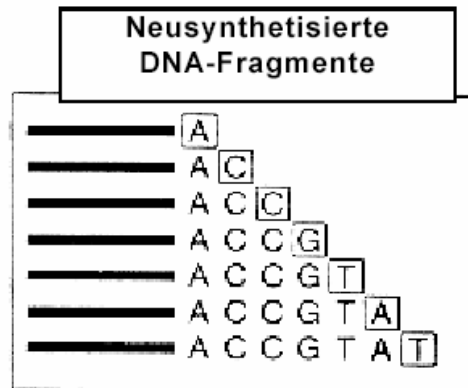
Enzyme,  
dNTPs,  
ddNTPs,  
Puffer

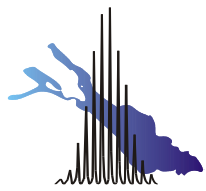
Primer

Template

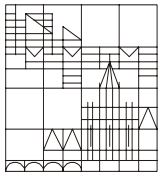


**30 Zyklen →  
Millionenfache DNA Vermehrung!**

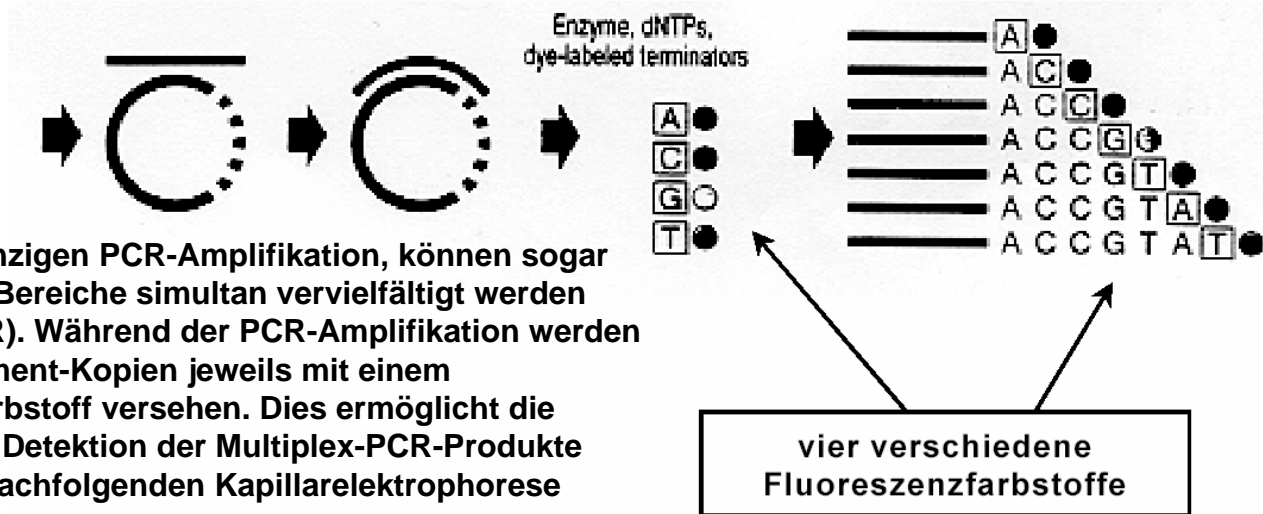




# Kapillarelektrophorese mit Laserdetektion der fluoreszenzmarkierten PCR-Amplifikate



Denaturierung    Annealing    Extension    Neusynthetisierte DNA-Fragmente

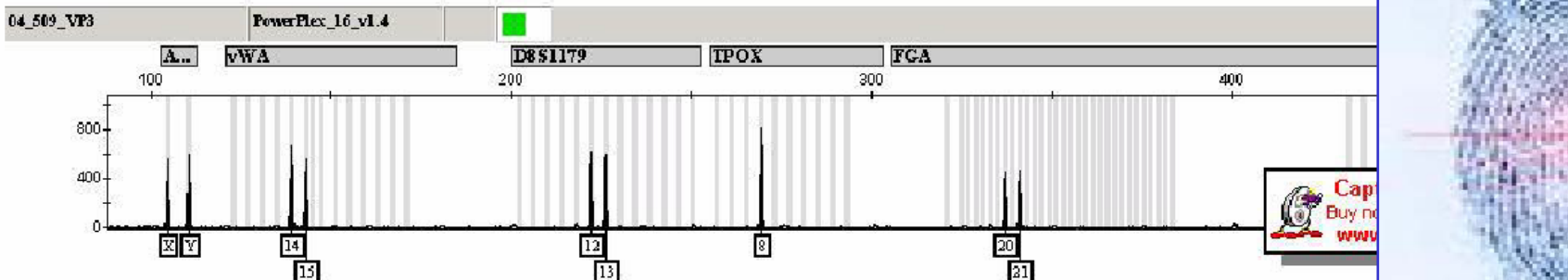
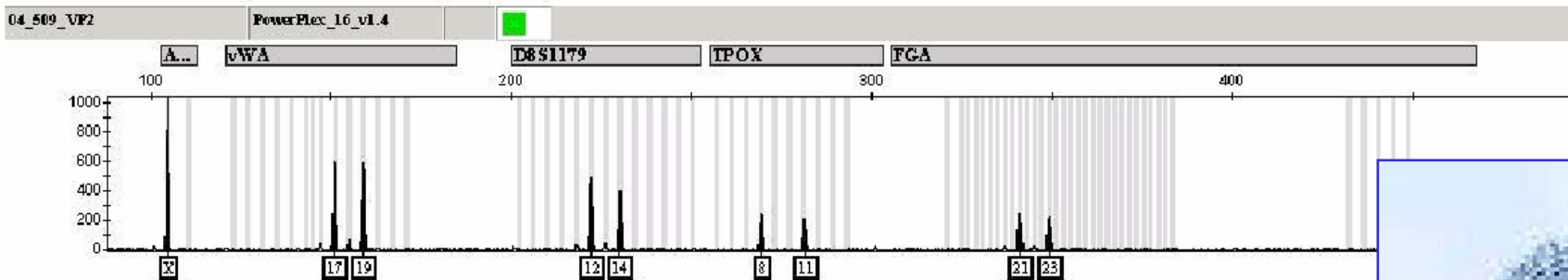
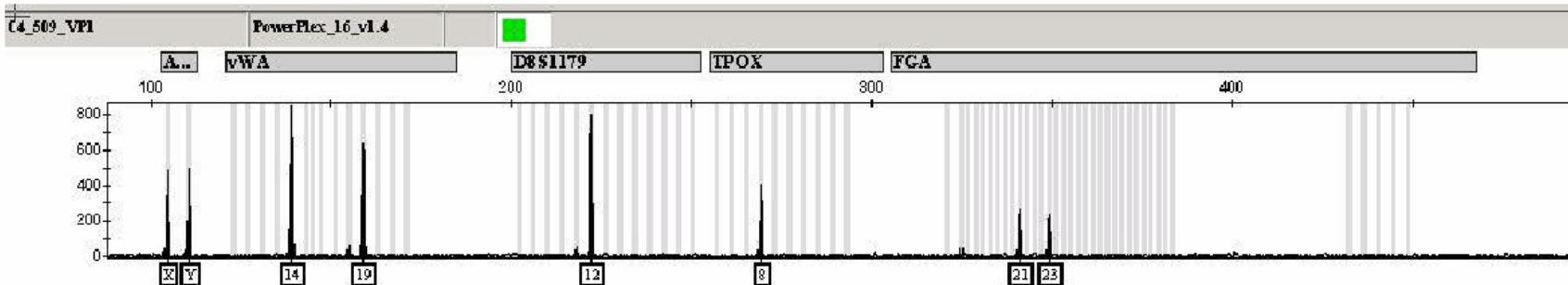


In nur einer einzigen PCR-Amplifikation, können sogar mehrere DNA-Bereiche simultan vervielfältigt werden (Multiplex-PCR). Während der PCR-Amplifikation werden die DNA-Fragment-Kopien jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen. Dies ermöglicht die diskriminative Detektion der Multiplex-PCR-Produkte während der nachfolgenden Kapillarelektrophorese



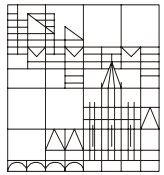
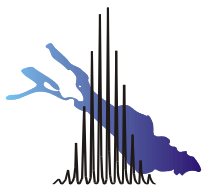
# DNA-Analysen in der Rechtsmedizin: Identifikation (PCR / Kapillarelektrophorese)

Multiplex PCR PowerPlex. 16 System (Promega Corp. USA)



Daktyloskopische Sicherung von Fingerabdrücken auf menschlicher Haut mit anschließender DNA-Typisierung: genetische Bestimmung phänotypisch erkennbarer Eigenschaften (z. B. Haarfarbe / Rothaarigkeit)

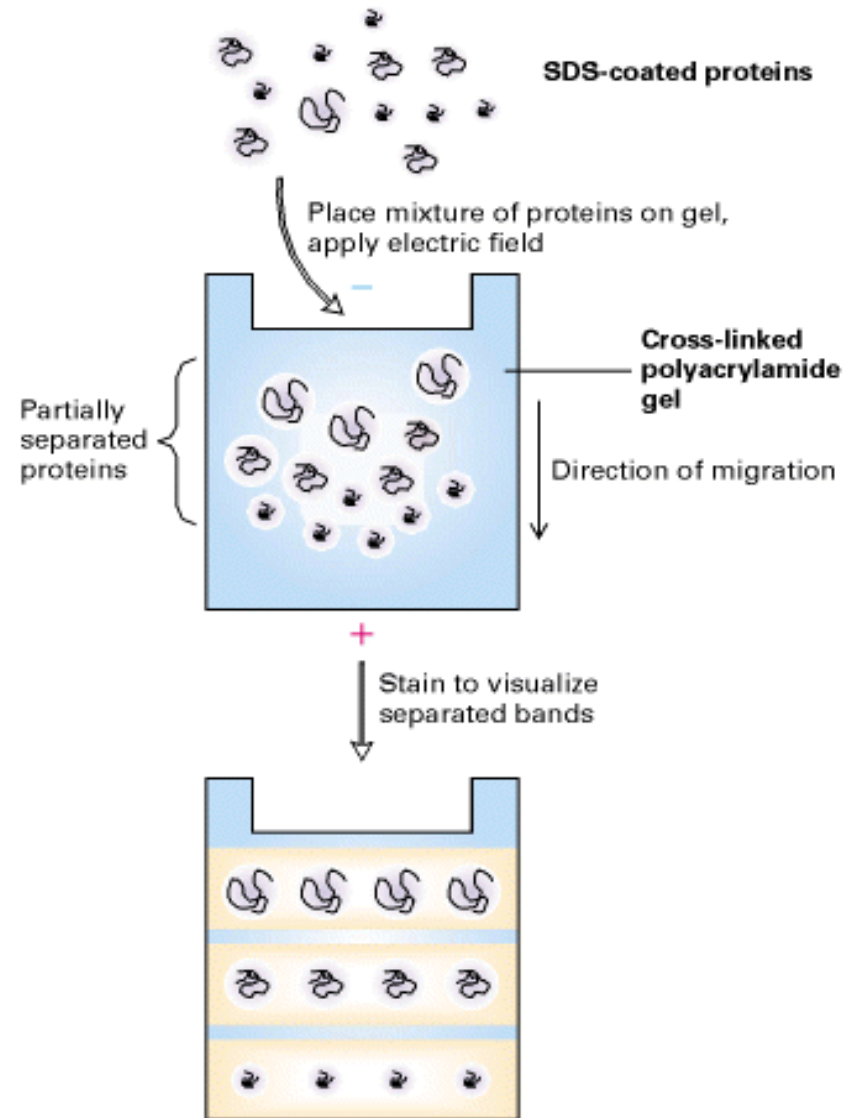
# Gelelektrophorese - SDS-PAGE



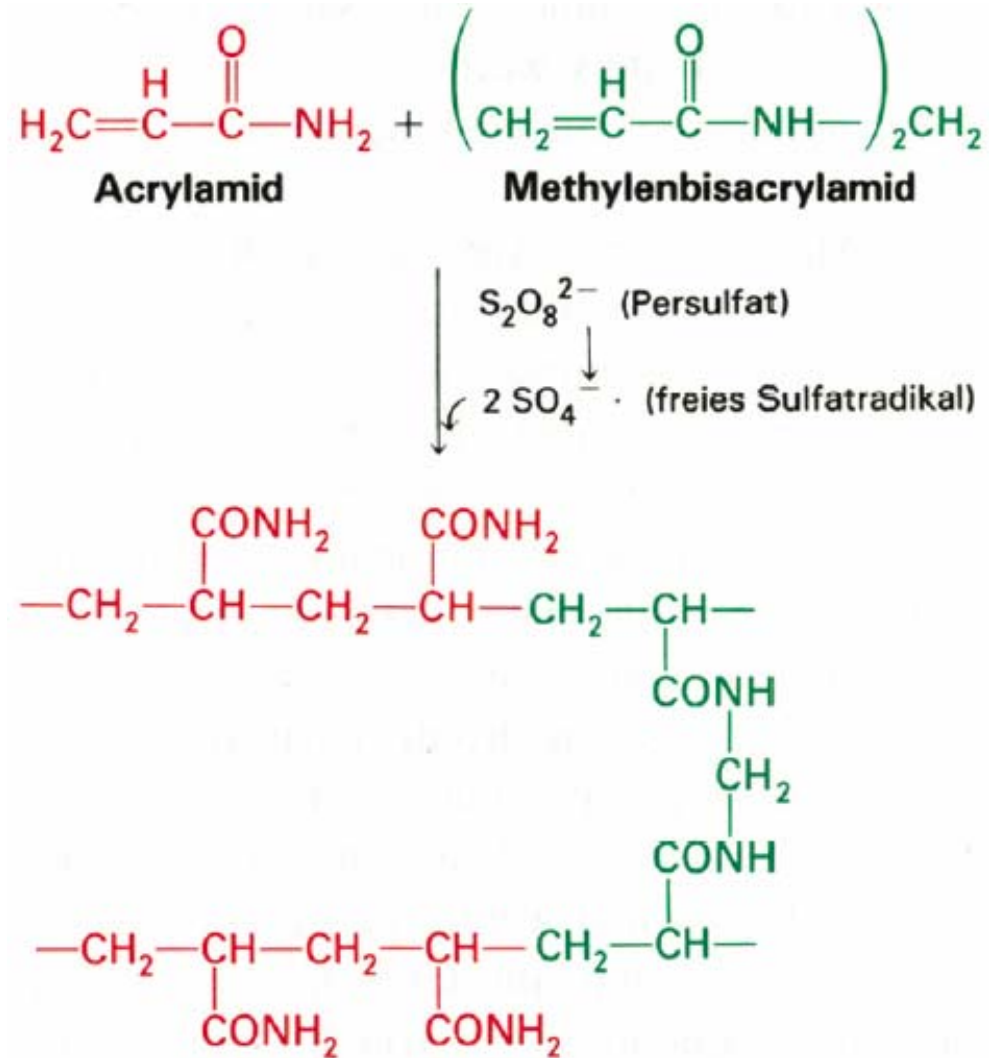
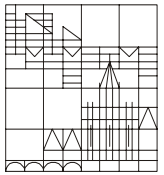
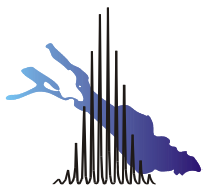
Die Proteine werden im Gelstreifen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt. Durch das SDS erhalten die Proteine eine negativ geladene Oberfläche.

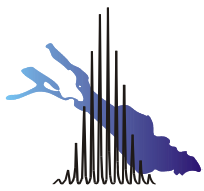
Der Gelstreifen wird mit einem SDS-Polyacrylamid-Gel verbunden, in das die Proteine nun einwandern und der Größe nach aufgetrennt werden.

Die Proteine werden mit Farbstoffen visualisiert

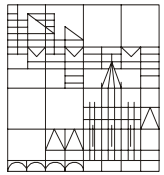


# Gelelektrophorese - SDS-PAGE





# Die Migration geladener Probenbestandteile (Debye-Hückel-Henry)

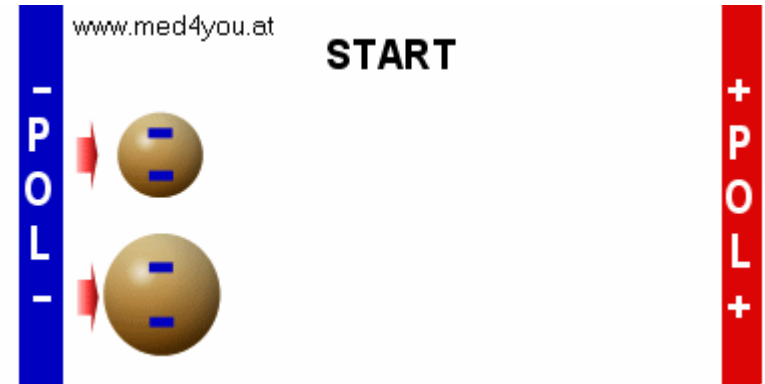


## Die Ladung



Je größer die Ladung, desto schneller ist die Wanderung

## Die Größe



Je kleiner das Teilchen, desto schneller ist die Wanderung

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot F = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_H} \cdot F$$

$v_{ep}$  : elektrophoretische Geschwindigkeit

$\mu_{ep}$  : elektrophoretische Mobilität

$F$  : elektrische Feldstärke

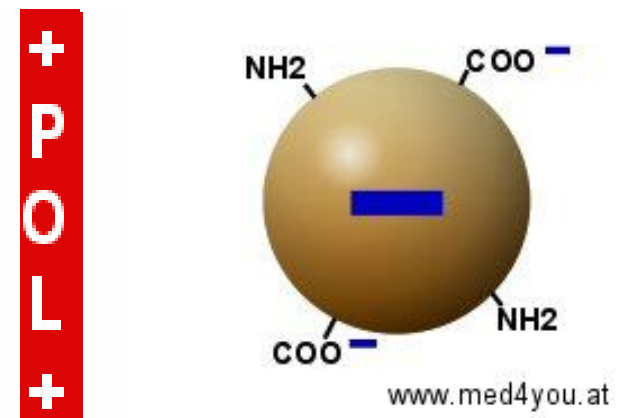
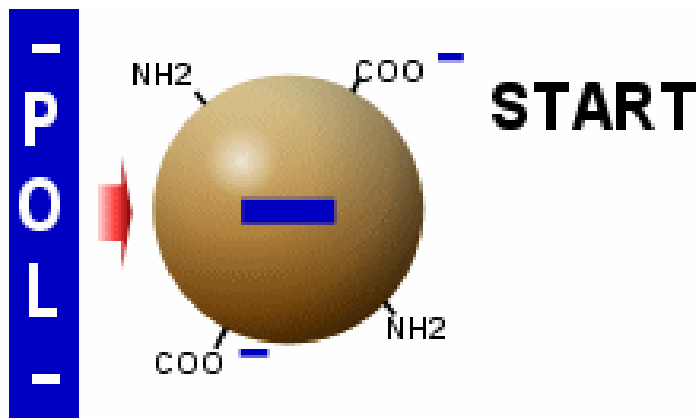
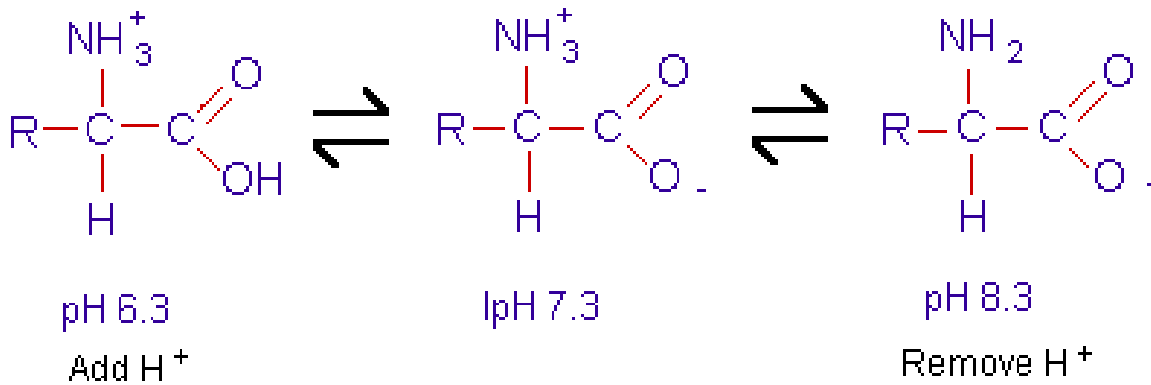
$q$  : Ladung des Ions

$\eta$  : dynamische Viskosität des Puffers

$r_H$  : Radius des hydratisierten Ions

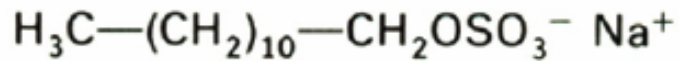
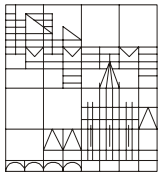
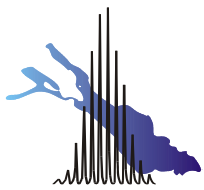
# Elektrophorese von Proteinen

Charge on amino acids and proteins with pH changes.



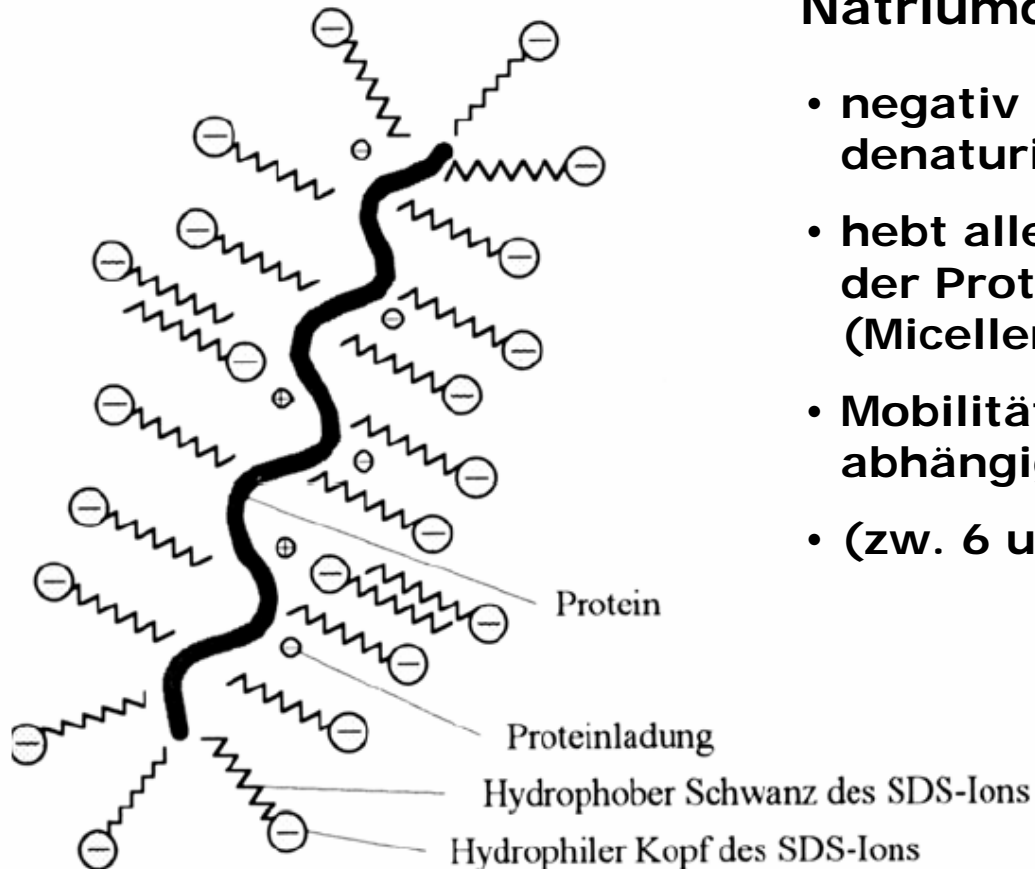


# Gelelektrophorese - SDS-PAGE



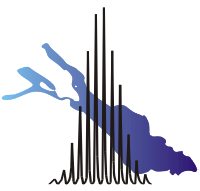
## Natriumdodecylsulfat (SDS)

- negativ geladenes, stark denaturierendes Detergenz
- hebt alle nichtkovalenten Bindungen der Proteinstruktur auf (Micellenbildung)
- Mobilität der SDS-Proteinkomplexe abhängig von Acrylamid-Konzentration
- (zw. 6 u. 15%)

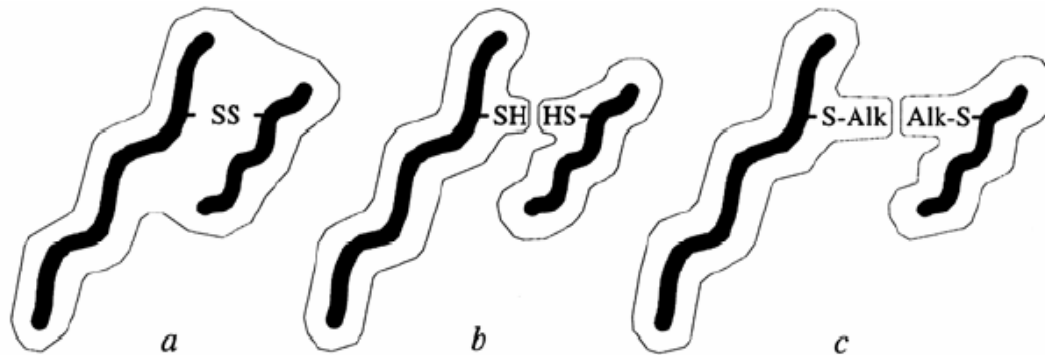
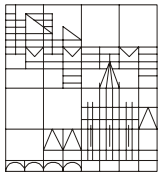


Struktur eines Protein-SDS-Komplexes.

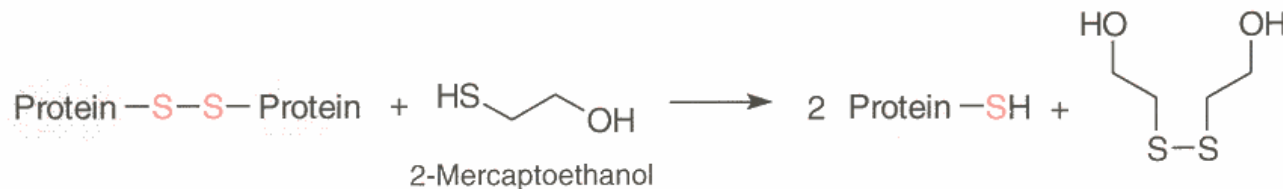
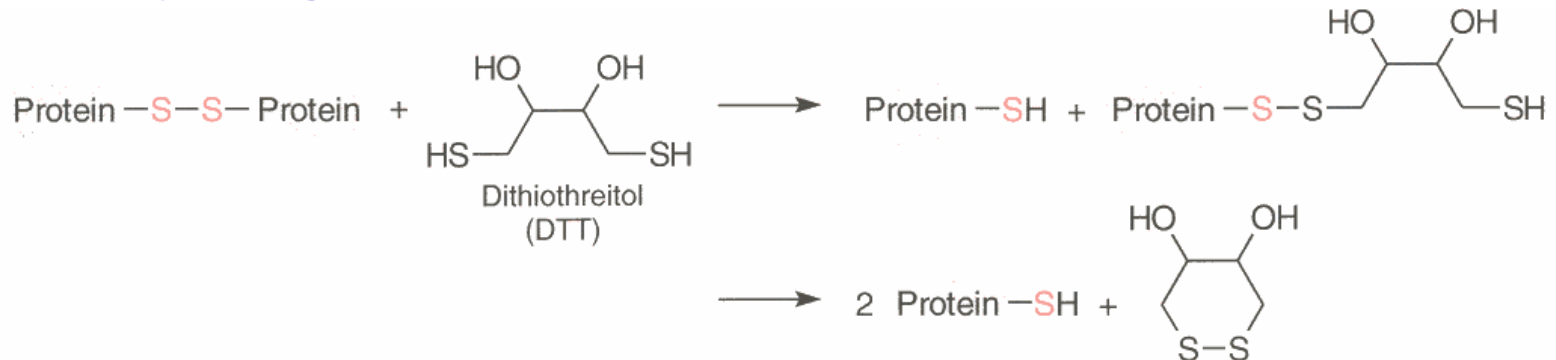


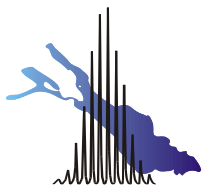


# Gelelektrophorese - SDS-PAGE

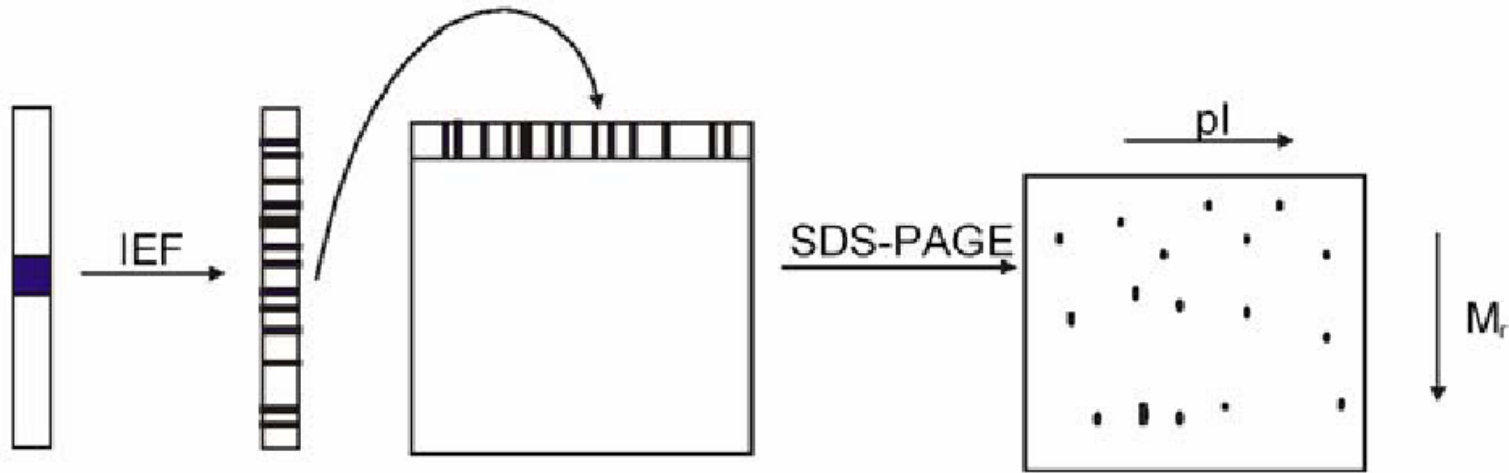
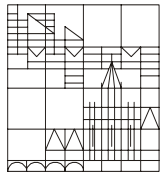


**Dithiothreitol (DTT) oder Mercaptoethanol spalten die Disulfidbrücken der Proteine**  
**Durch Alkylierung wird dieser Prozess irreversibel.**





# 2D Gelelektrophorese



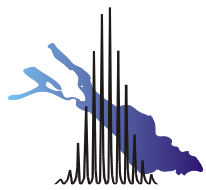
**1. Dimension:**  
Isoelektrische Fokussierung

Auftrennung nach Ladung ( $pI$ )

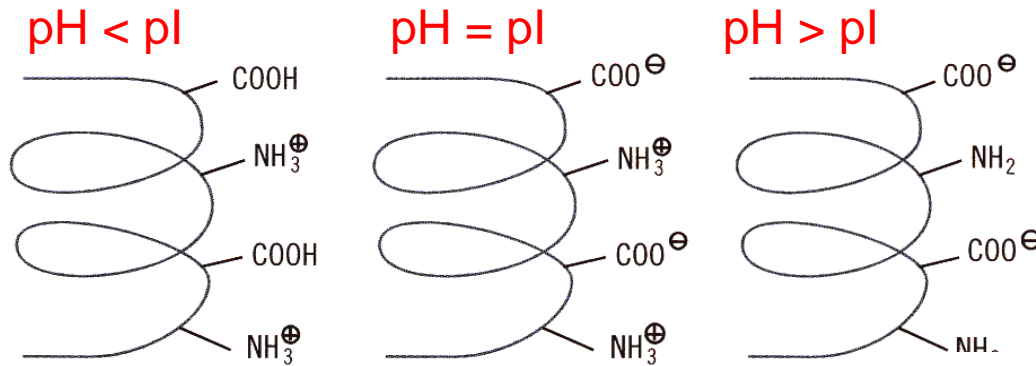
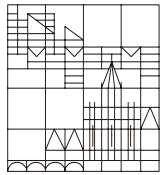
**2. Dimension:**  
SDS-PAGE

Auftrennung nach Masse ( $M_r$ )

- **Viele Proteine (bis zu 3000 Spots) können gleichzeitig visualisiert werden**
- **Massenspektrometrie möglich**



# Gelelektrophorese: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

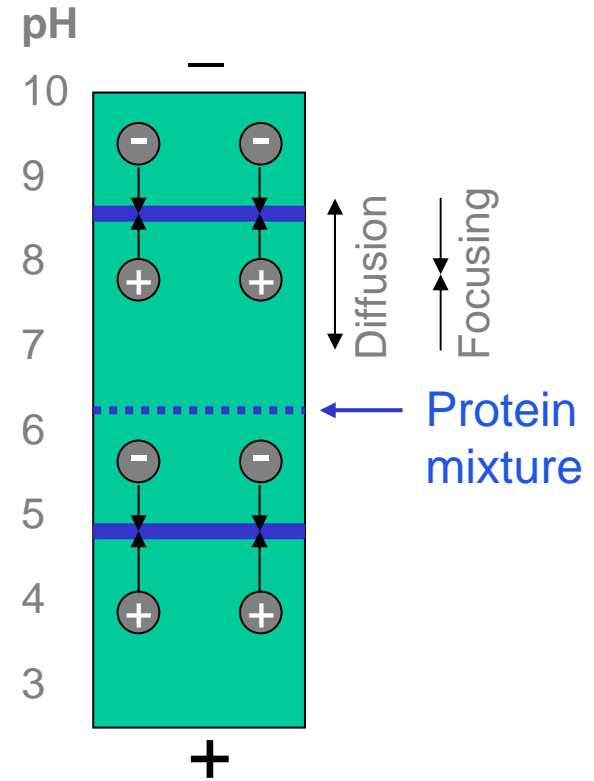


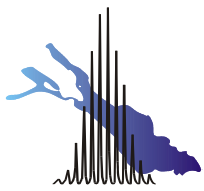
*Buffering groups (R's) for the Immobiline DryStrip pH gradient are covalently linked to the polyacrylamide matrix.*

Polyacrylamide

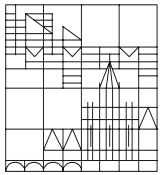
Buffer

**Polyacrylamidgelstreifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten. In diesem pH-Gradienten bewegen sich die Proteine so lange vorwärts, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreichen. So werden die Proteine im Gel fixiert.**

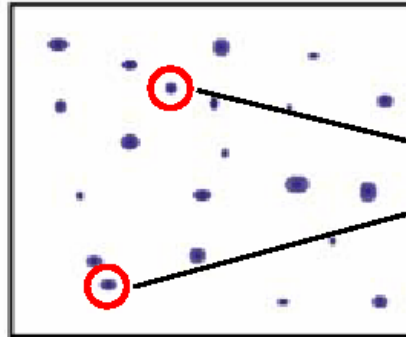




# 2D Gelelektrophorese

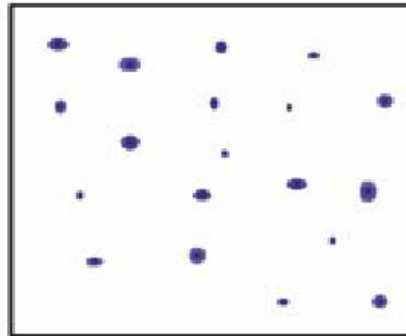


Proteine aus einem erkrankten Gewebe



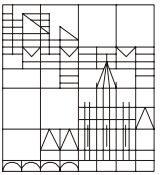
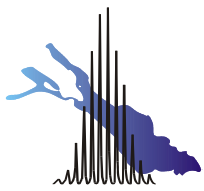
ausschneiden und analysieren.

Kontrolle: Proteine aus einem gesunden Gewebe



**Die zweidimensionale Elektrophorese (2D Elektrophorese) verbunden mit der Massenspektrometrie ist gegenwärtig eine der am weitesten verbreiteten Methoden zur Trennung und Analyse von Proteinen**

# Alzheimer-spezifische Hirnproteine (2D-Gelelektrophorese)



MW  
(kDa)

116 -

97 -

66 -

45 -

29 -

pI

3

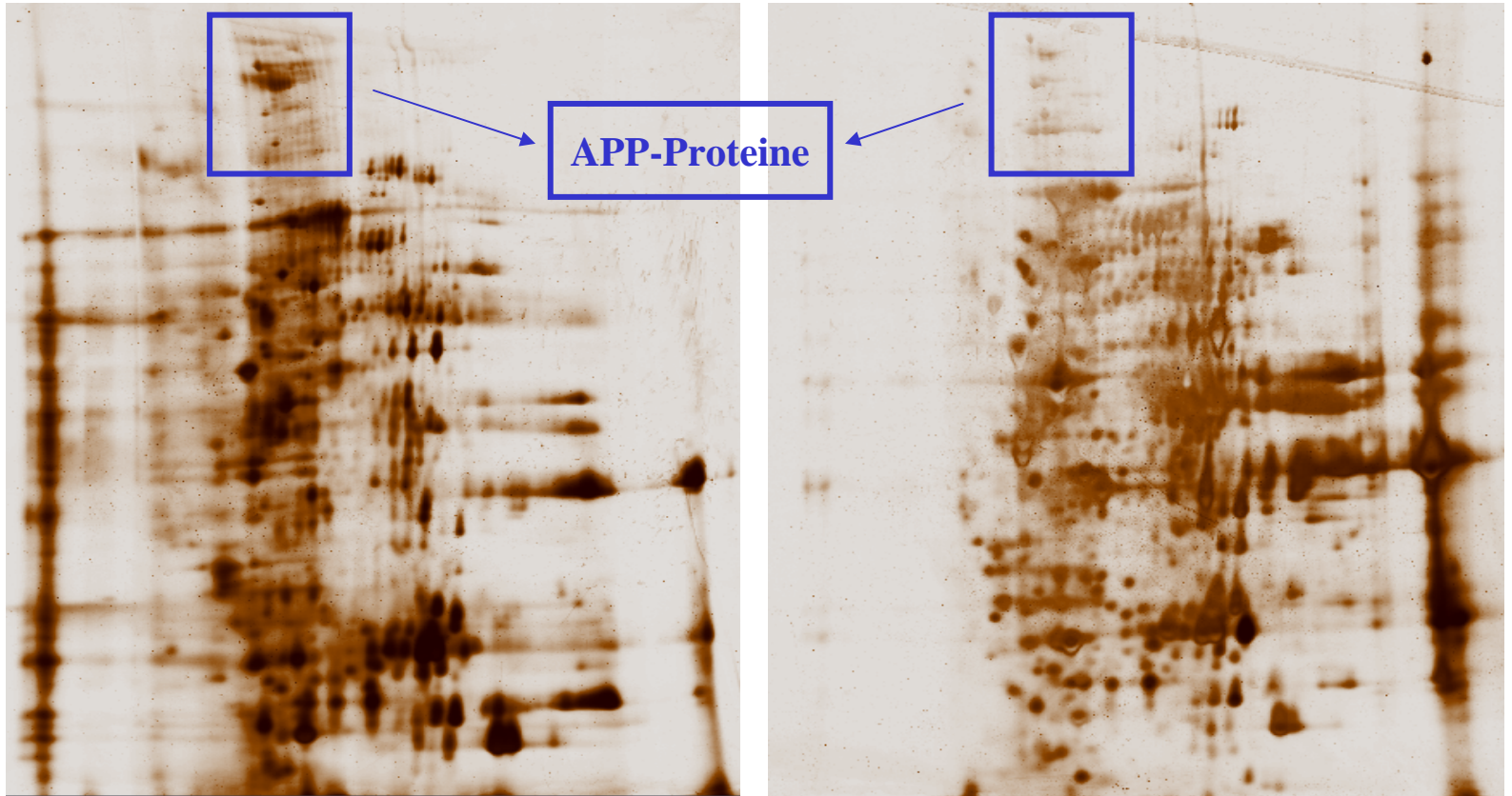
10

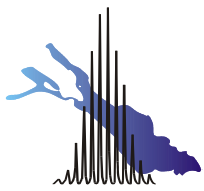
(Alzheimer-Patient)

APP-Proteine

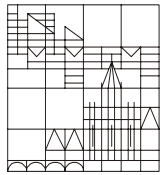
3

10





# Schlüssel-Technologien der Proteomanalytik

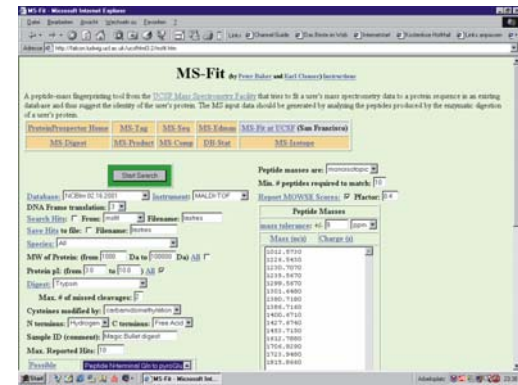
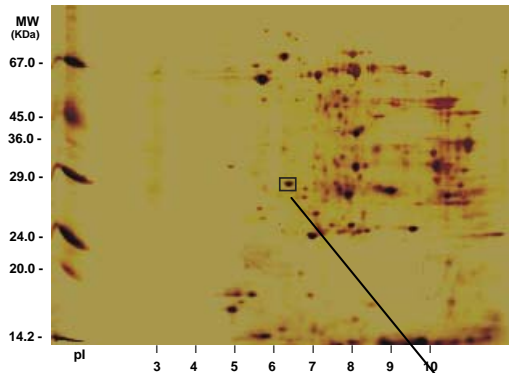


Protein-Trennung / Isolierung

Protein-Identifizierung

Gelelektrophorese

Datenbanksuche / Bioinformatik



Proteolytischer Abbau

Massenspektrometrie

„Peptid-kartierung“:

Peptid-Gemisch

Sequenz / Molekülspezifische Identifizierung

