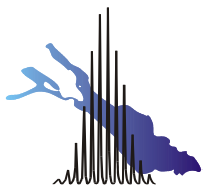


ANALYTISCHE CHEMIE I

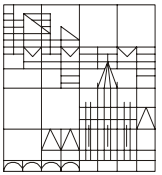
Trennmethoden

3. Spezielle LC-Methoden

WS 2007/2008



Spezielle LC – Methoden



- **Molekülausschlußchromatographie (Gelfiltrations- oder Gelpermeationschromatographie)**

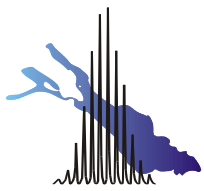
Durch unterschiedliche Zugänglichkeit der Probenmoleküle in die Poren der stationären Phase kommt es zur Trennung auf Grund unterschiedlicher Molekülgröße (Siebeffekt)

- **Ionenaustauschchromatographie**

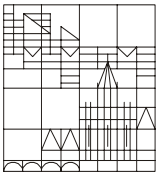
Die Trennung erfolgt auf Grund unterscheidlicher Ionenladung und Ionengröße. Die stationäre Phase ist ein Ionenaustauscher.

- **Affinitätschromatographie**

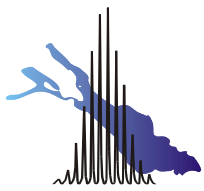
Die Trennung erfolgt durch sehr spezifische Wechselwirkung mit der stationären Phase. Die stationäre Phase ist mit einem geeigneten Bindungspartner gekoppelt.



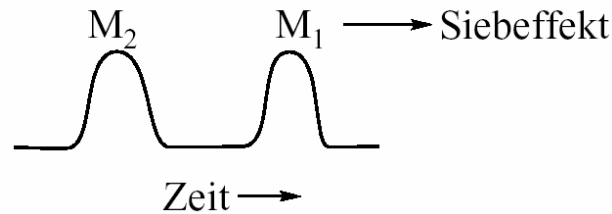
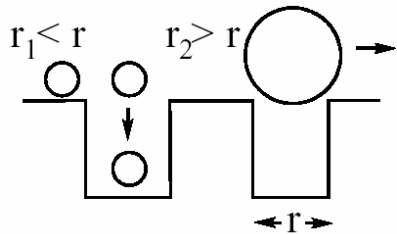
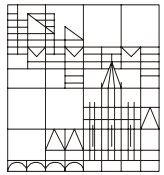
Grundlagen der Gelfiltration



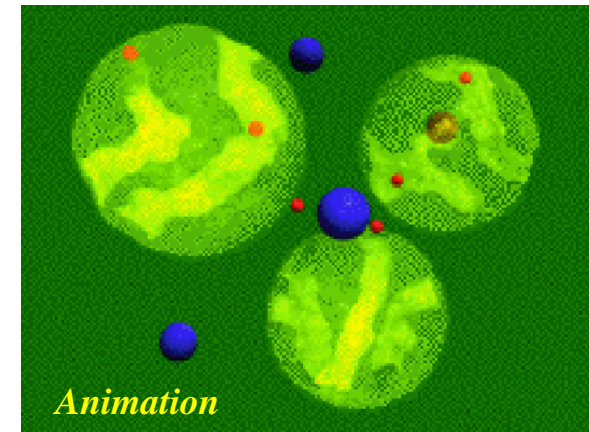
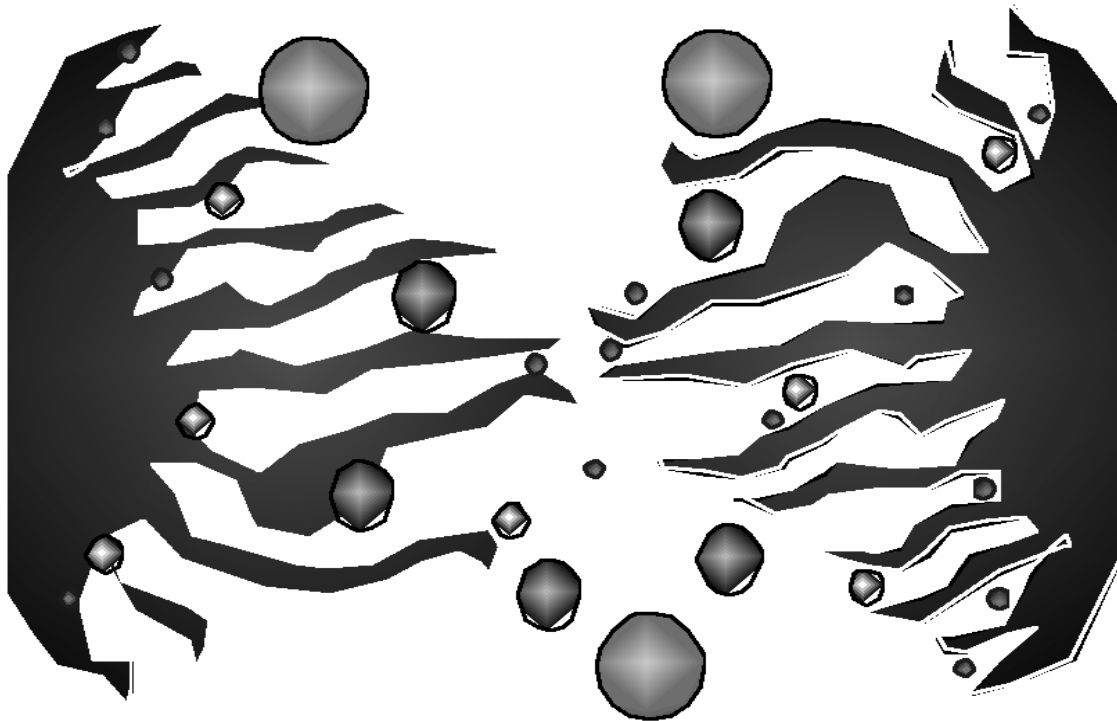
- Säulenchromatographisches Trennverfahren, bei dem Substanzen nach ihrer Molekülgröße getrennt werden.
- Verwendung poröser Gele als Säulenmaterial (Matrix)
- Der Porendurchmesser dieser Gele liegt in einem definierten Größenbereich.
- Moleküle, die größer als die größten Poren der Matrix sind, werden mit der mobilen Phase ohne Verzögerung durch die Säule transportiert.
- Kleine Moleküle diffundieren in die Poren der Matrix und legen dadurch eine größere Wegstrecke zurück.

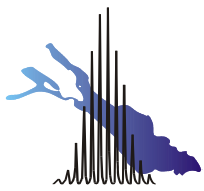


Trennprinzip der Molekülausschluss- /Gelchromatographie

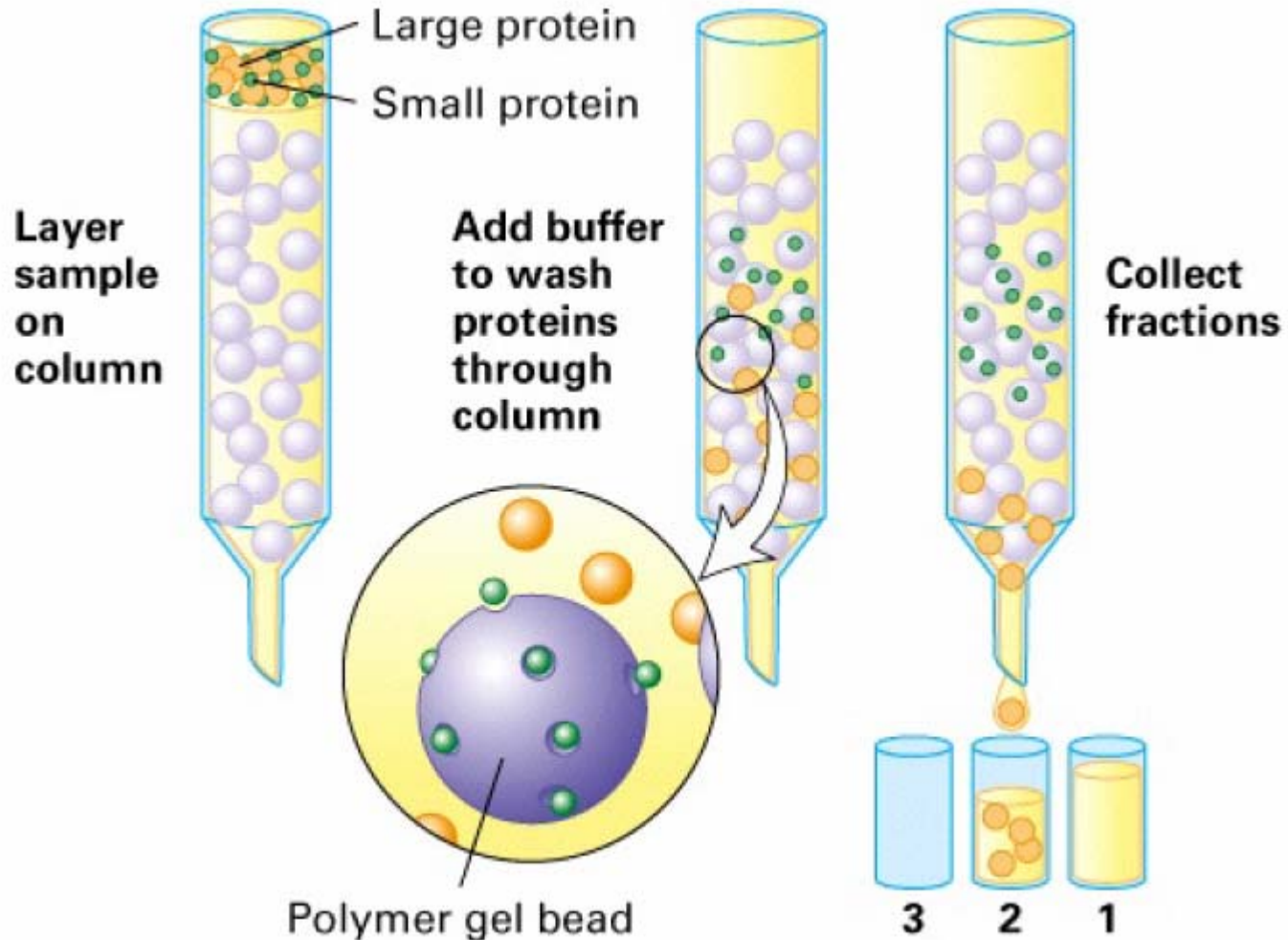
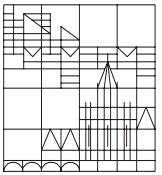


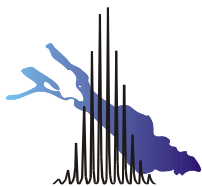
- große Proteine können nicht in die Gelmatrix eindringen und werden "ausgeschlossen",
- kleine Proteine dringen in die Matrix ein und benötigen folglich länger um durch die Säule zu wandern.



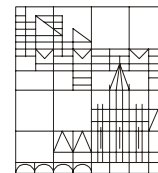


Prinzip der Gelfiltration



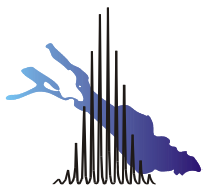


Gelfiltrationchromatographie

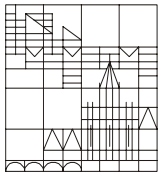


Trennmaterialien für Gelfiltration

Name ^a	Type	Fractionation Range (kD)
Sephadex G-10	Dextran	0.05–0.7
Sephadex G-25	Dextran	1–5
Sephadex G-50	Dextran	1–30
Sephadex G-100	Dextran	4–150
Sephadex G-200	Dextran	5–600
Bio-Gel P-2	Polyacrylamide	0.1–1.8
Bio-Gel P-6	Polyacrylamide	1–6
Bio-Gel P-10	Polyacrylamide	1.5–20
Bio-Gel P-30	Polyacrylamide	2.4–40
Bio-Gel P-100	Polyacrylamide	5–100
Bio-Gel P-300	Polyacrylamide	60–400
Sepharose 6B	Agarose	10–4,000
Sepharose 4B	Agarose	60–20,000
Sepharose 2B	Agarose	70–40,000
Bio-Gel A-5	Agarose	10–5000
Bio-Gel A-50	Agarose	100–50,000
Bio-Gel A-150	Agarose	1000–150,000

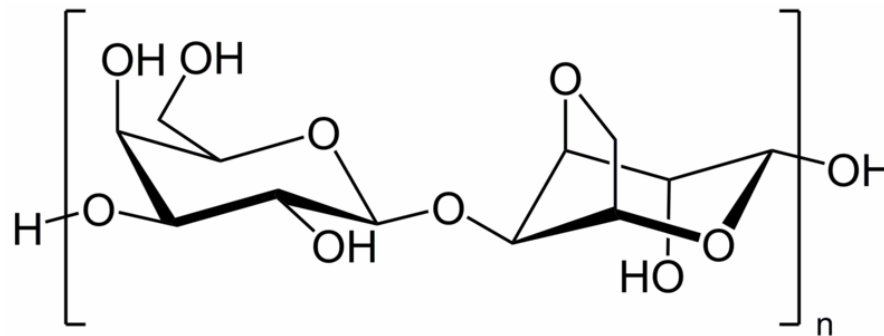


Gelfiltrationchromatographie



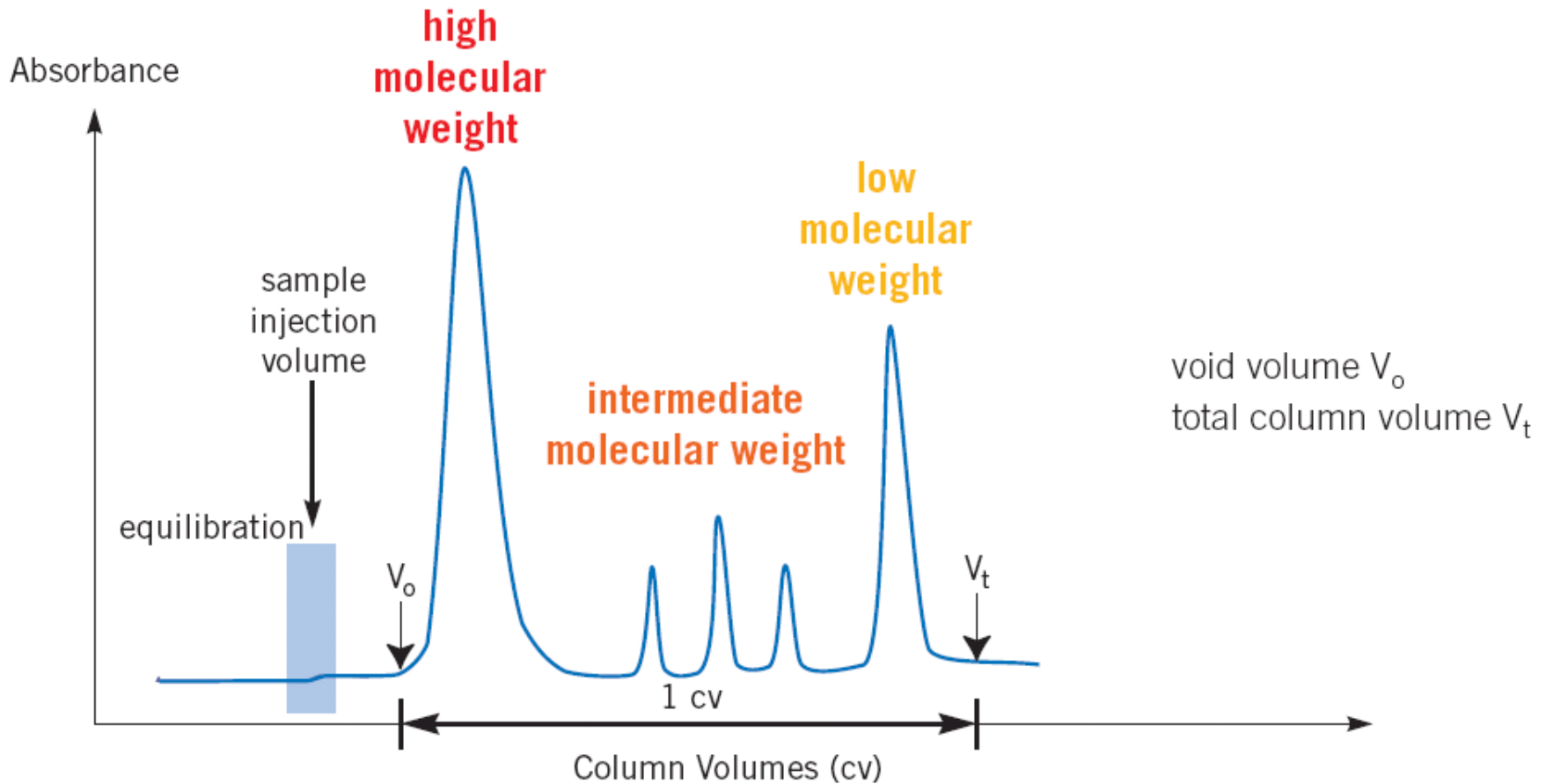
Trennmaterialien für Gelfiltration - Agarose

Agarose ist ein **Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactose**, die glycosidisch miteinander verbunden sind. Es stellt die Hauptkomponente des Agars dar und wird vor allem aus den Rotalgengattungen Gelidium und Gracillaria gewonnen. Agarose ist ein **starker Gelbildner** und für die Gelierfähigkeit des Agars verantwortlich.

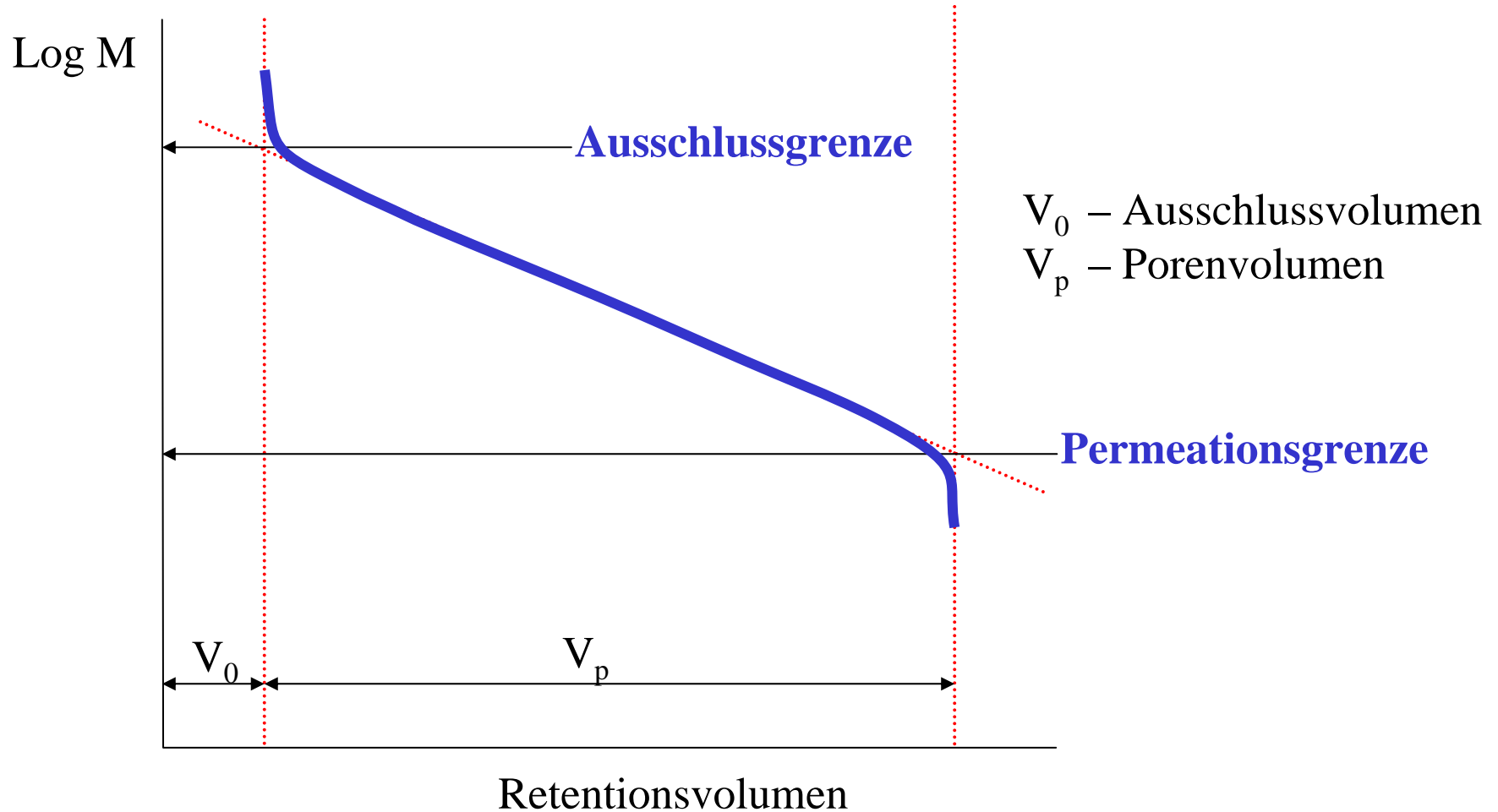
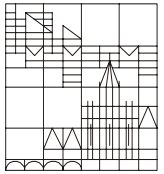
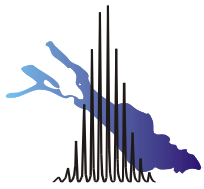


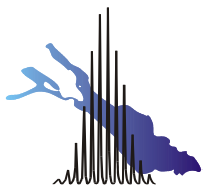
Gelfiltrationschromatographie

Elutionsprofil einer Gelfiltrationssäule

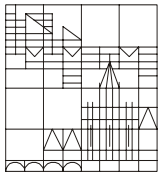


Verwendung der Gelchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung





Verwendung der Gelchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung



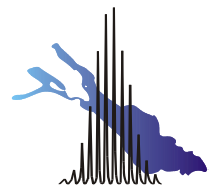
- $V_t = V_p + V_0$

V_t , Bett Volumen der Säule;

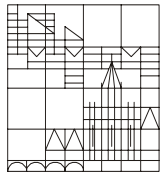
V_p , Volumen der Gelbeads;

V_0 , Volumen des Lösungsmittel um die Beads (void volume); Typischerweise ist $V_0 \sim 35\%$ von V_t

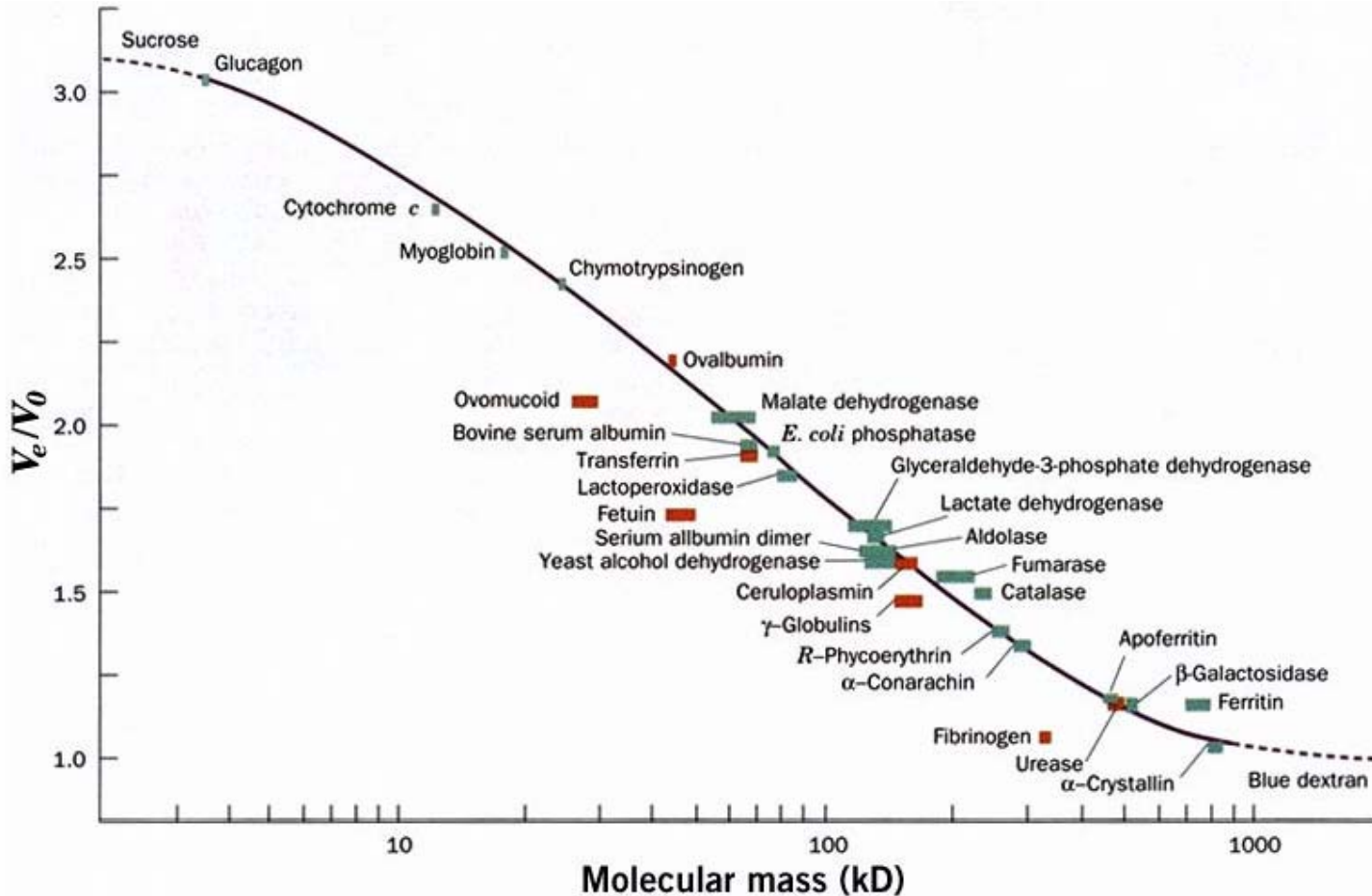
- V_e , Elutionsvolumen eines bestimmten Proteins
- Relatives Elutionsvolumen, charakteristisch für jedes Protein, normalisiert für Säulengröße, V_e/V_0



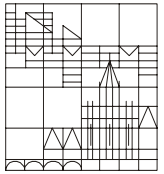
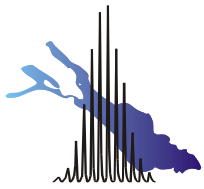
Verwendung der Gelchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung



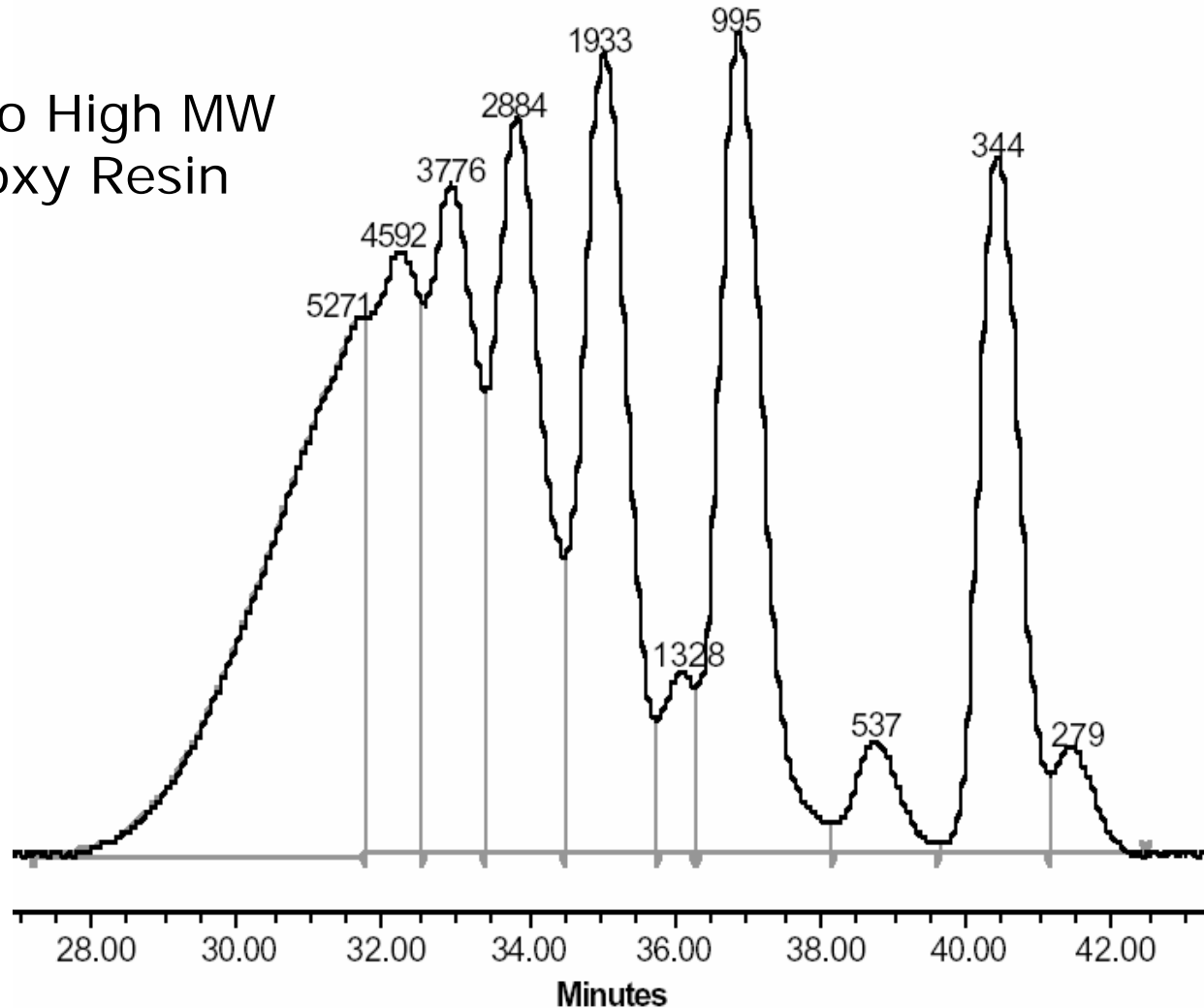
Das relative Elutionsvolumen eines Proteins, V_e/V_0 , ist invers proportional zu seiner Masse

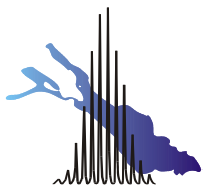


Verwendung der Gelchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung

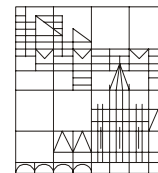


Mid to High MW
Epoxy Resin



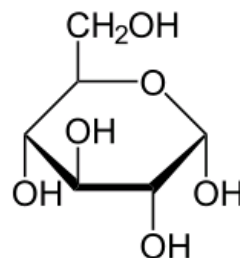
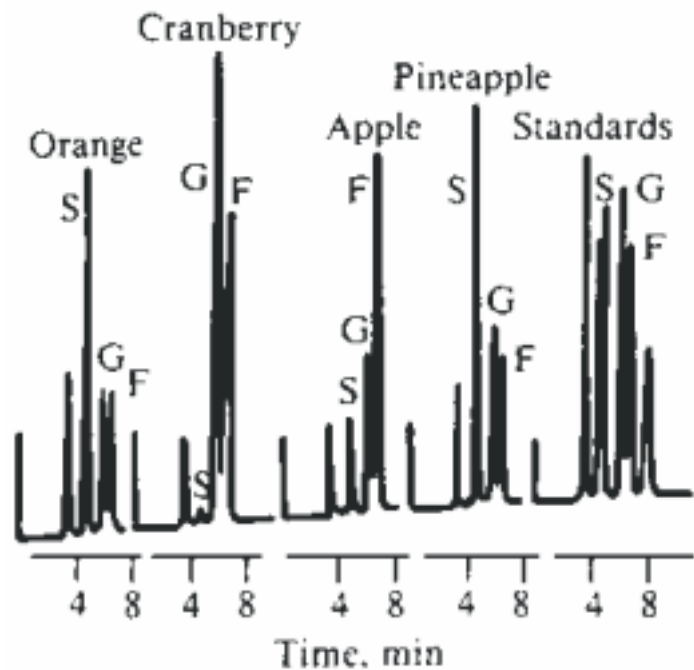


Anwendung der Gelchromatographie

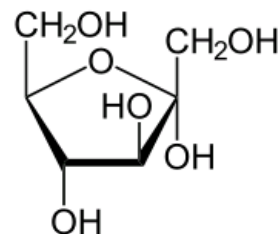


Beispiel:

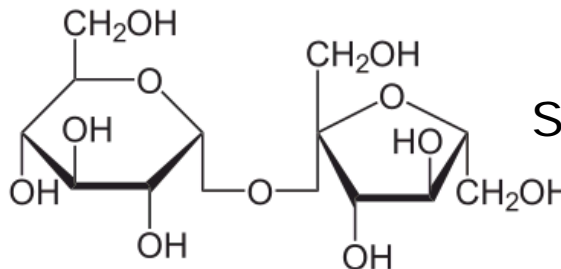
Gel-Filtrations-Bestimmung von Glukose (G), Fruktose (F) und Sukrose (S) in kommerziellen Fruchtsäften



Glukose (G)

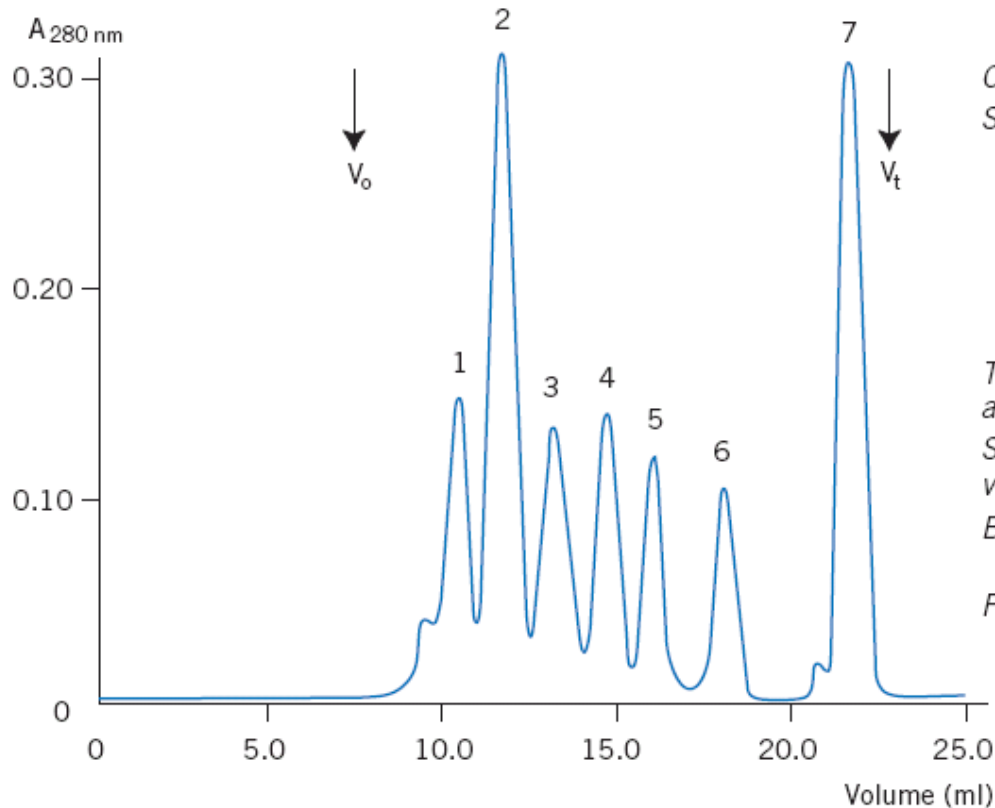
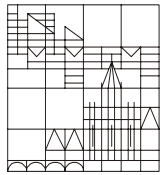
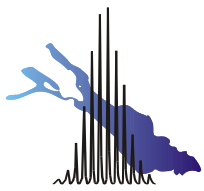


Fruktose (F)



Sucrose (S)

Anwendung der Gelfiltrationschromatographie für Proteine



Column:

Superdex 200 HR 10/30

Sample:

1. Thyroglobulin (M_r 669 000), 3.0 mg/ml
2. Ferritin (M_r 440 000), 0.7 mg/ml
3. Human IgG (M_r 150 000), 3.0 mg/ml
4. Human transferrin (M_r 81 000), 3.0 mg/ml
5. Ovalbumin (M_r 43 000), 3.0 mg/ml
6. Myoglobin (M_r 17 600), 2.0 mg/ml
7. Vitamin B12 (M_r 1 355), 0.5 mg/ml

Total sample amount:

0.38 mg

Sample volume:

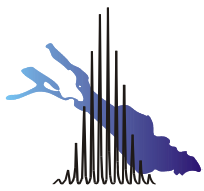
25 ml

Buffer:

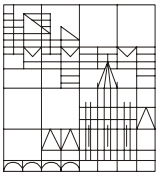
0.05 M sodium phosphate,
0.15 M NaCl, pH 7.0

Flow:

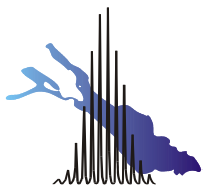
0.25 ml/min (19 cm/h)



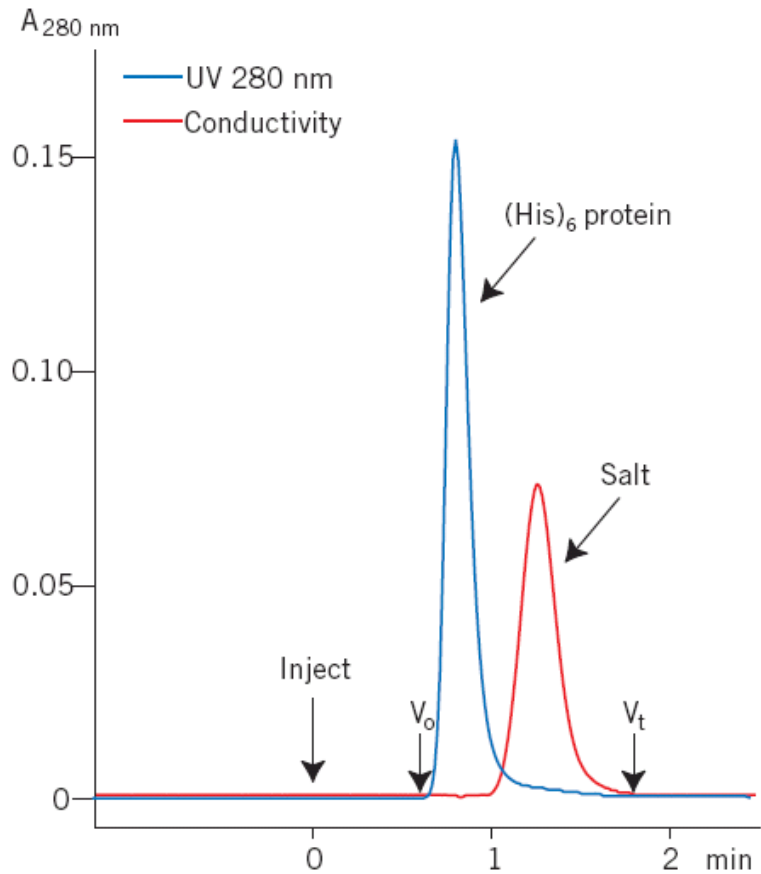
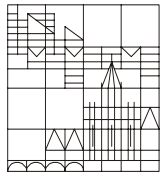
Detektoren für die Gelfiltrationschromatographie



- Als Detektoren finden sogenannte **Konzentrationsdetektoren** wie **Brechungsindexdetektoren** (RI-Detektor von engl. refractive index) und **UV-Detektoren** Verwendung. Bei diesen Detektoren steigt die Peakfläche proportional mit der Konzentration, was eine Quantifizierung einer Substanz ermöglicht
- Unter dem Synonym der **molmassensensitiven Detektoren** finden weiterhin **Viskositätsdetektoren** und **Lichtstreuungdetektoren** Verwendung. Dieser Detektortyp ist nur in Kombination mit Konzentrationsdetektoren verwendbar, weil zur Molmassenberechnung in jedem Fall die Konzentration benötigt wird



Detektoren für die Gelfiltrationschromatographie

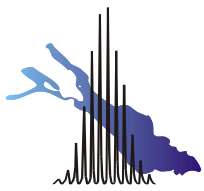


Sample: (His)₆ protein eluted from HiTrap™ Chelating HP with sodium phosphate 20 mM, sodium chloride 0.5 M, imidazole 0.5 M, pH 7.4

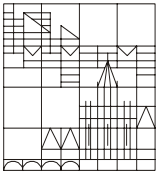
Column: HiTrap Desalting 5 ml

Buffer: Sodium phosphate 20 mM, sodium chloride 0.15 M, pH 7.0

void volume V_0 , total column volume V_t

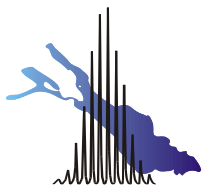


Grundlagen der Ionenaustauschchromatographie

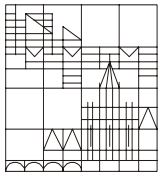


- Chromatographisches Trennverfahren für Substanzen mit elektrischen Ladungen
- Verwendung einer unlöslichen, polymeren Matrix mit chemisch gebundenen ionischen Gruppen
- die Gegenionen dieser Gruppen sind durch elektrostatische Kräfte nur locker gebunden
- Gegenionen können gegen Ionen der mobilen Phase ausgetauscht werden (reversibel)

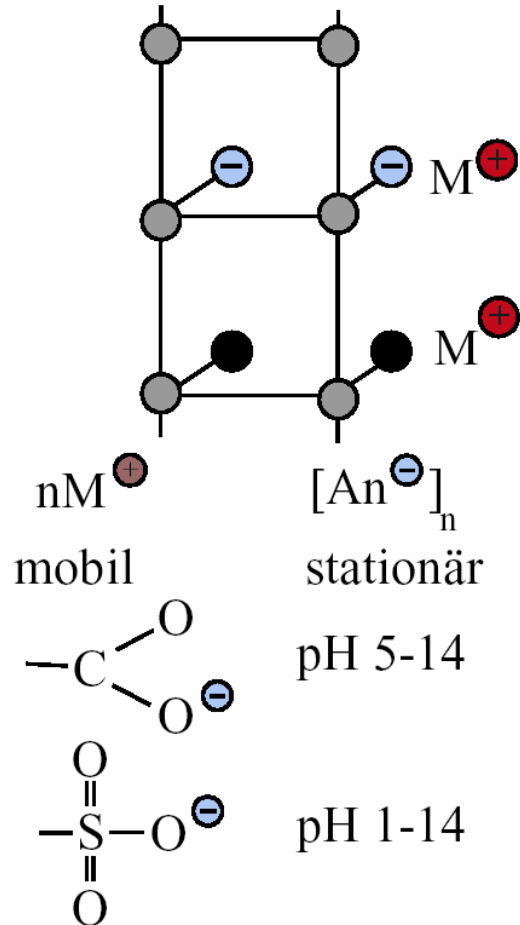




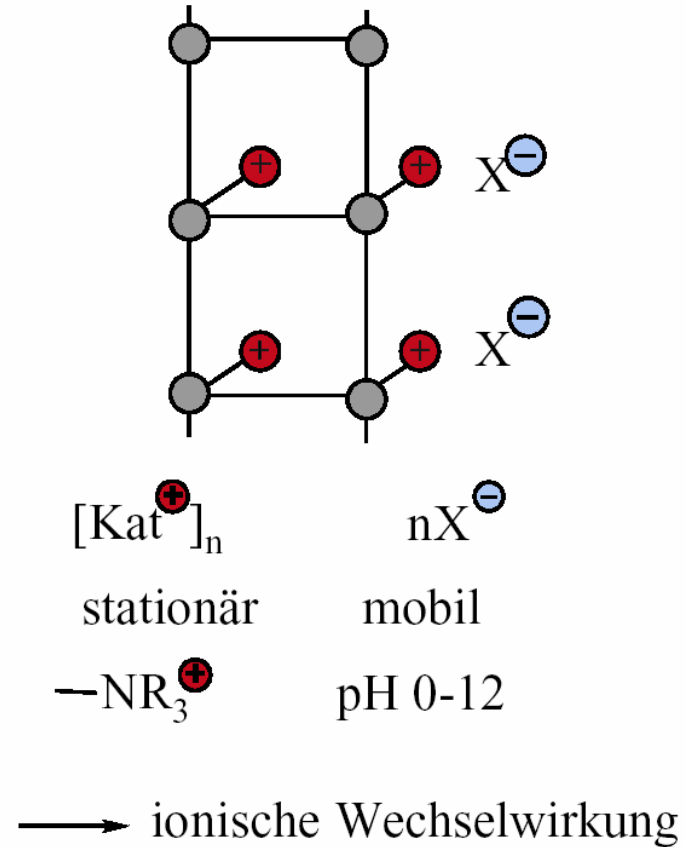
Ionenaustauschchromatographie

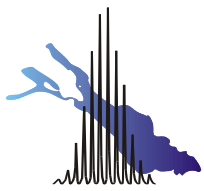


Kationenaustauscher

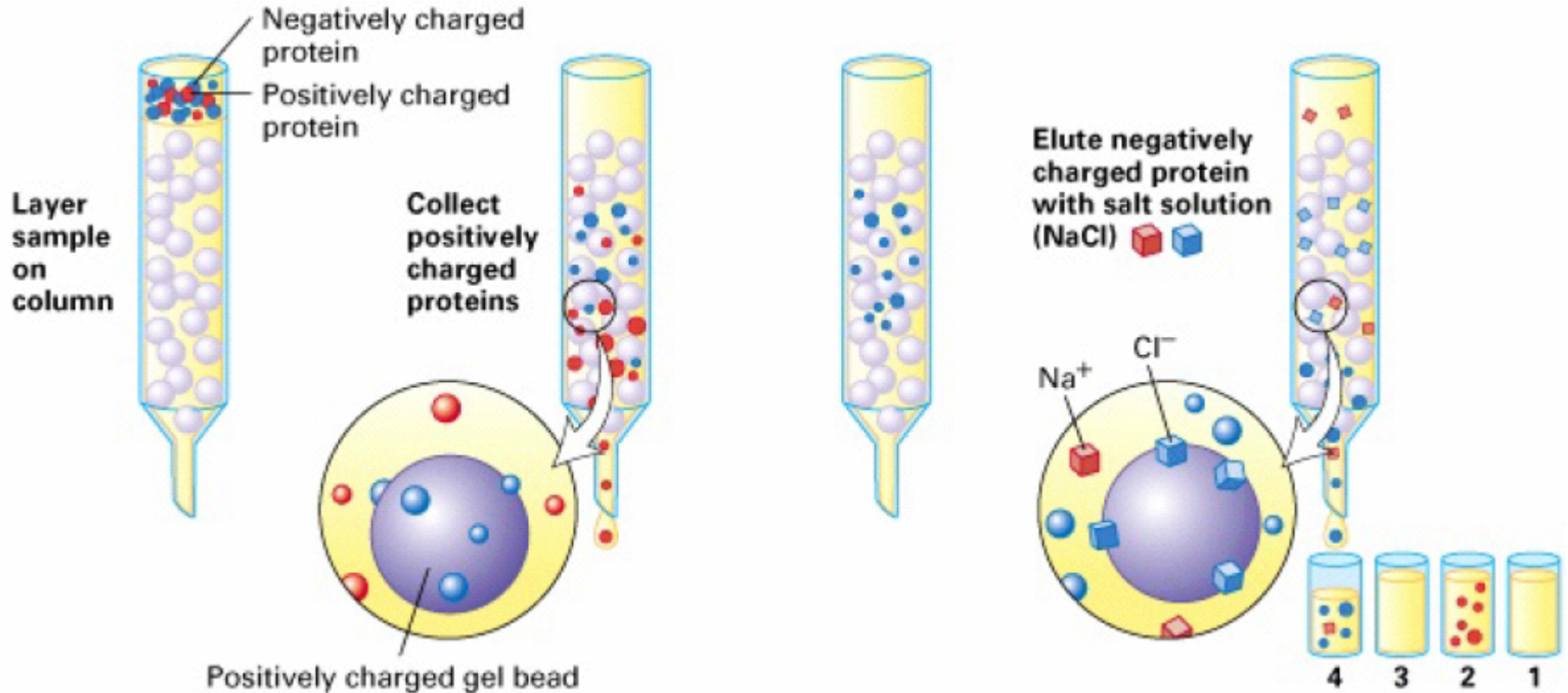
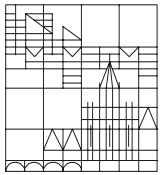


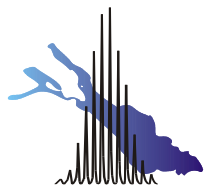
Anionenaustauscher



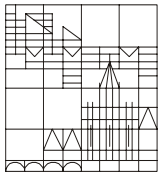


Ionenaustauschchromatographie



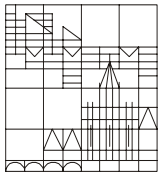
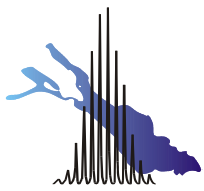


Einteilung von Ionenaustauschern



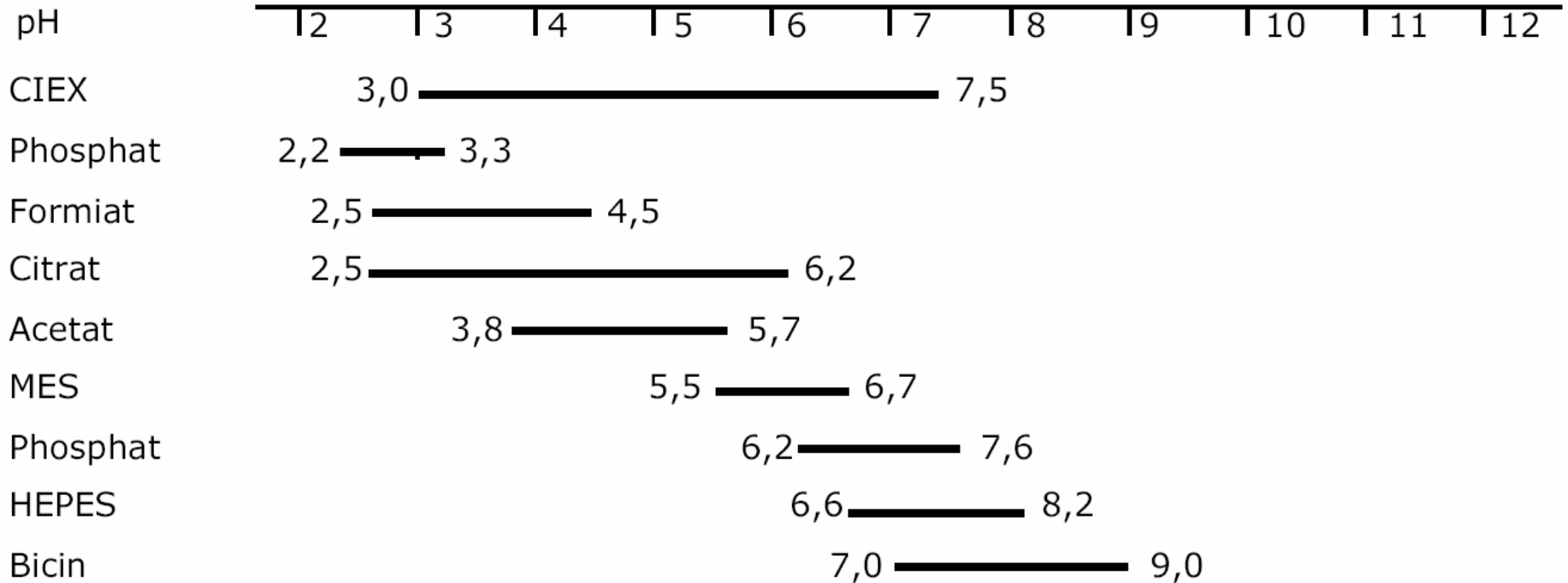
Ionenaustauschermatrizes bestehen aus einem Polymer (quervernetzte Agarose), das negativ oder positiv geladene Gruppen trägt.

<i>Art des Ionenaustauschers</i>	<i>funktionelle Gruppe</i>	
Kationenaustauscher		
stark sauer	Sulfonsäure	-SO ₃ H
	Phosphonsäure	-PO(OH) ₂
schwach sauer	Hydroxy-Gruppe	-OH
	Carboxy-Gruppe	-COOH
Anionenaustauscher		
stark basisch	quartäres Amin	-N ⁺ (CH ₃) ₃
	DEAE (Diethylaminoethyl-)	-(CH ₂) ₂ -N ⁺ H(C ₂ H ₅) ₂
schwach basisch	primäre Aminogruppe	-NH ₂
	sekundäre Aminogruppe	-NH-
	tertiäre Aminogruppe	-N-

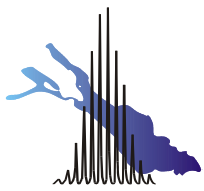


Ionenaustauschchromatographie

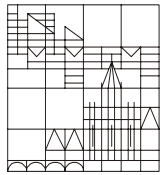
Puffer für Kationenaustauscher



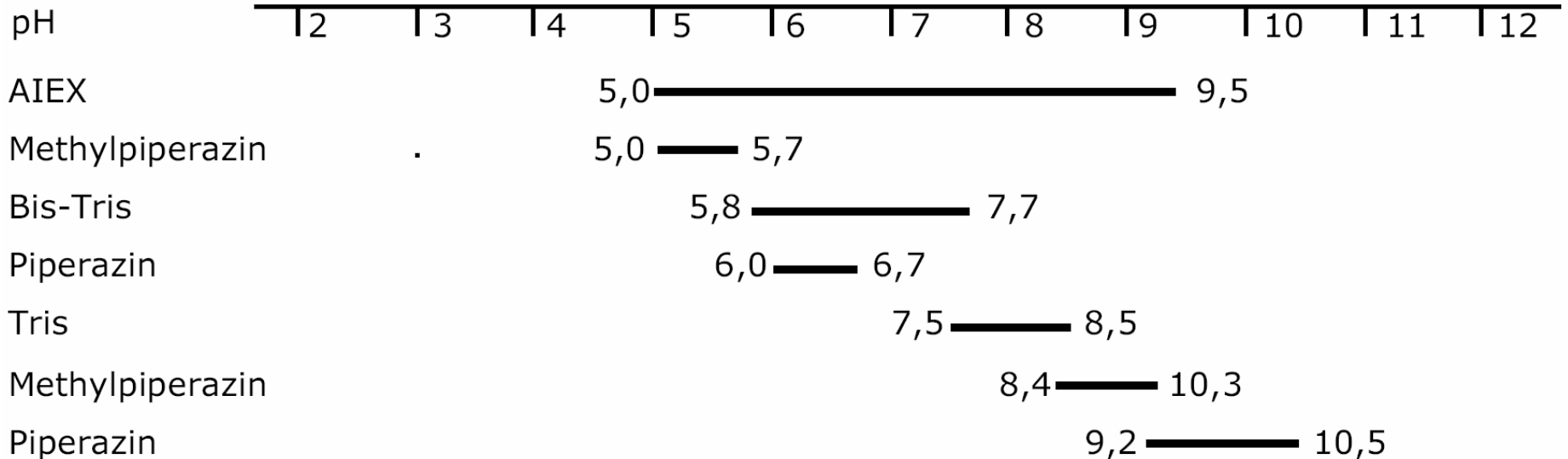
CIEX: $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na-Format}/\text{Na-Acetat}$, MES: Morpholinoethansulfonsäure,
HEPES: Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure



Ionenaustauschchromatographie

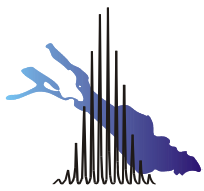


Puffer für Anionenaustauscher

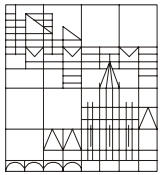


AIEX: Methylpiperazin/Bis-Tris/Tris, Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

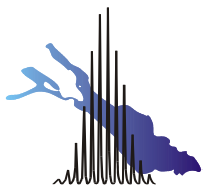
Bis-Tris: 2,2-Bis-(hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan,



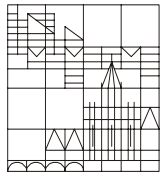
Anwendungen der Ionenchromatographie



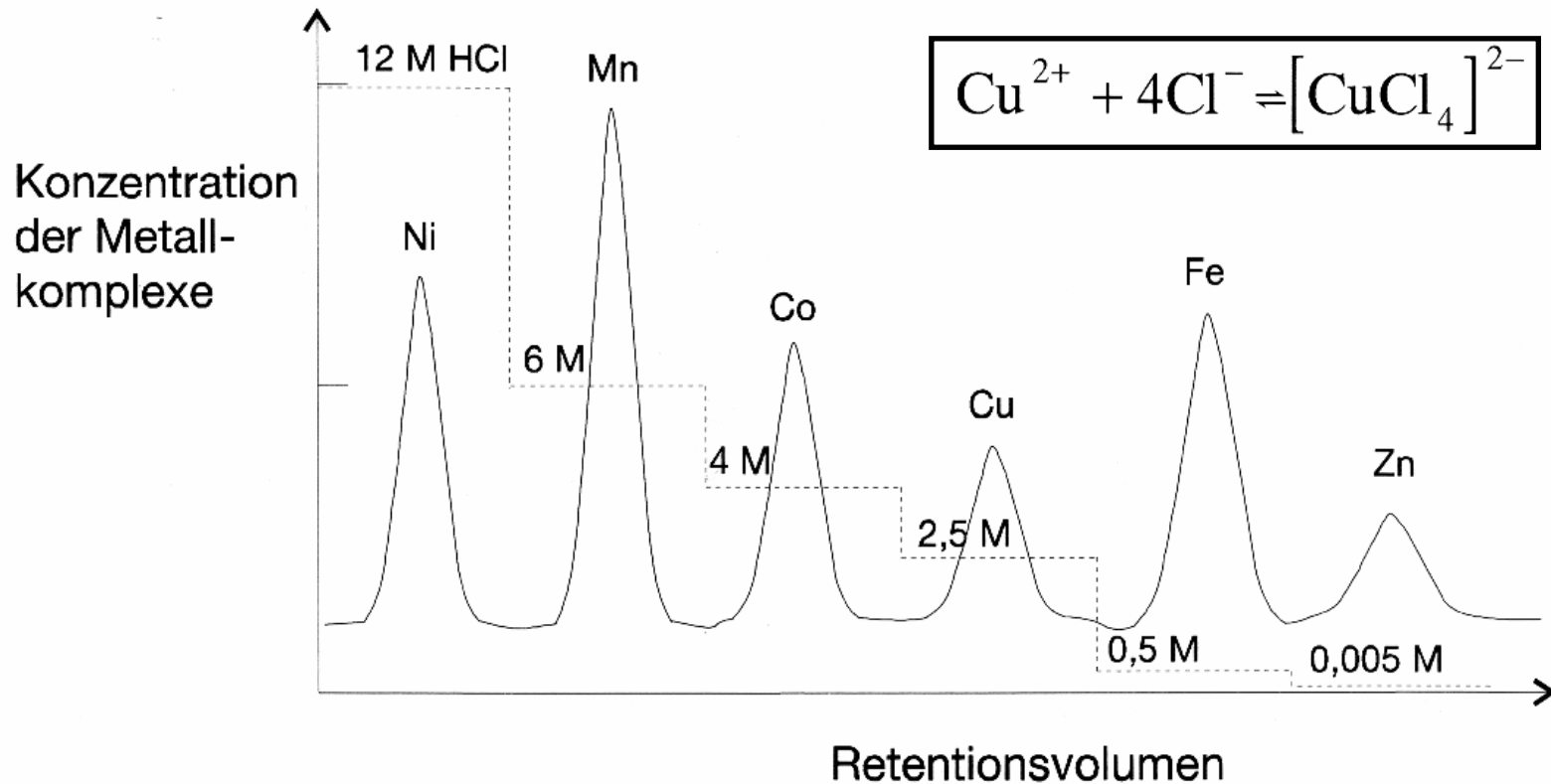
- Auftrennung von organischen und anorganische Ionen (insbesondere von Anionen, für die nur wenige verlässliche Trennmethode existieren)
- Bestimmung von Kohlenhydraten an Anionentauschern (KH sind im alkalischen Milieu geladen!)
- Bestimmung von Aminosäuren an Kationentauschern (Aminosäuren sind amphotere Substanzen und liegen unterhalb von $\text{pH}=6$ vollständig als Kationen vor)
- Wichtige Methode bei der Trennung von Proteinen (AEC an schwachen Anionenaustauschern)

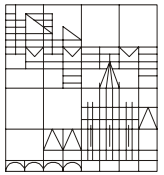
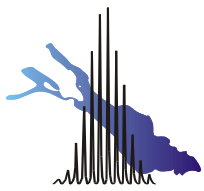


Ionenchromatographische Analyse von Kationen



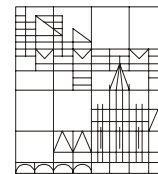
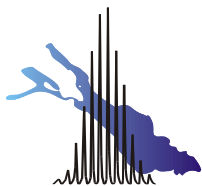
Trennung von **Metallionen** als **Chlorkomplexe** an einem stark basischen Anionenaustauscher mit einem stufenförmigen Gradienten des Eluenten HCl





Suppressor (1)

- Suppressoren werden angewandt, wenn die Detektion mittels **Leitfähigkeitsmessung** erfolgt.
- Aufgabe ist es, die **Grundleitfähigkeit des Eluenten** zu vermindern; deshalb erfolgt die Suppression, bevor die mobile Phase in die Leitfähigkeitsmesszelle eintritt.
- Ein Suppressor besteht im einfachsten Fall aus einer Ionenaustauschsäule in **Wasserstoffform**, das heißt die Austauschionen sind H^+ bzw. H_3O^+ . Folgende Gleichungen sollen diesen Austauschprozess verdeutlichen:

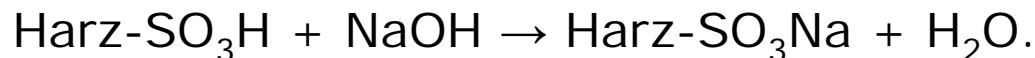


Suppressor (2)

- der Eluent ist Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3):

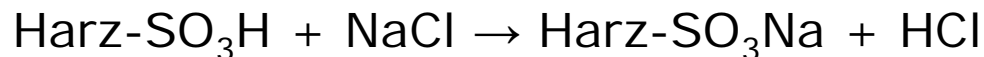


- der Eluent ist Natronlauge (NaOH):

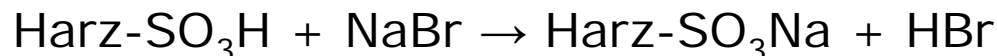


- Die nachzuweisenden Substanzen werden in analoger Weise in ihre korrespondierenden Säuren überführt:

Analysensubstanz ist Natriumchlorid (NaCl):



Analysensubstanz ist Natriumbromid (NaBr):

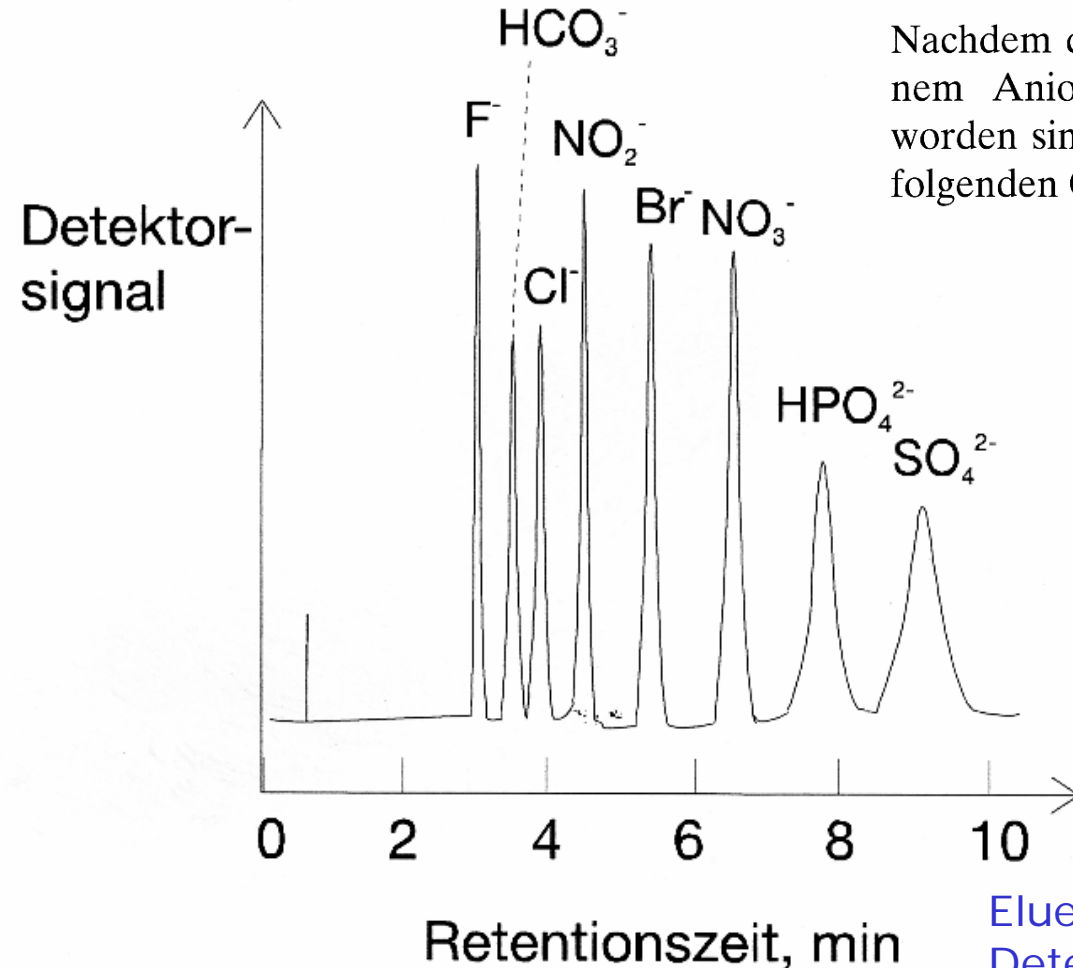
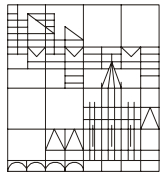
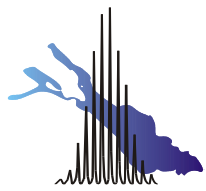


- Die Produkte der Suppressorreaktion der Eluenten sind fast nicht elektrisch leitend. Die Reaktionsprodukte der Analysensubstanzen sind im Gegensatz dazu sehr gut leitend, da sie im Wasser weitgehend dissoziieren:

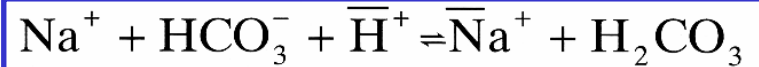


Ionenchromatographische Analyse von Anionen

(mit einer Suppressorsäule)



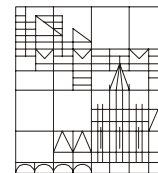
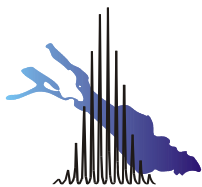
Nachdem die Anionen, wie Cl^- oder NO_3^- , in der mit einem Anionenaustauscher gepackten Säule aufgetrennt worden sind, reagiert der Eluent im Suppressor nach den folgenden Gleichgewichten:



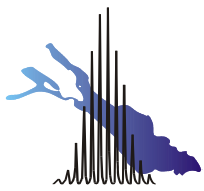
Eluent: 2.8 mM NaHCO_3 / 2.3 mM Na_2CO_3
Detektor: Leitfähigkeit

Ionenaustauschchromatographie

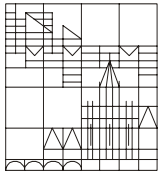
Anwendung für Proteine



Amino acid	Abbreviated names		M_r	pK_a values			pI	Hydropathy index*	Occurrence in proteins (%)
				pK_1 (-COOH)	pK_2 (-NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)			
Nonpolar, aliphatic R groups									
Glycine	Gly	G	75	2.34	9.60		5.97	-0.4	7.2
Alanine	Ala	A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Valine	Val	V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu	L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile	I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met	M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
Aromatic R groups									
Phenylalanine	Phe	F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr	Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	-1.3	3.2
Tryptophan	Trp	W	204	2.38	9.39		5.89	-0.9	1.4
Polar, uncharged R groups									
R groups									
Serine	Ser	S	105	2.21	9.15		5.68	-0.8	6.8
Proline	Pro	P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Threonine	Thr	T	119	2.11	9.62		5.87	-0.7	5.9
Cysteine	Cys	C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn	N	132	2.02	8.80		5.41	-3.5	4.3
Glutamine	Gln	Q	146	2.17	9.13		5.65	-3.5	4.2
Positively charged R groups									
R groups									
Lysine	Lys	K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidine	His	H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginine	Arg	R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1
Negatively charged R groups									
R groups									
Aspartate	Asp	D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	-3.5	5.3
Glutamate	Glu	E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	-3.5	6.3

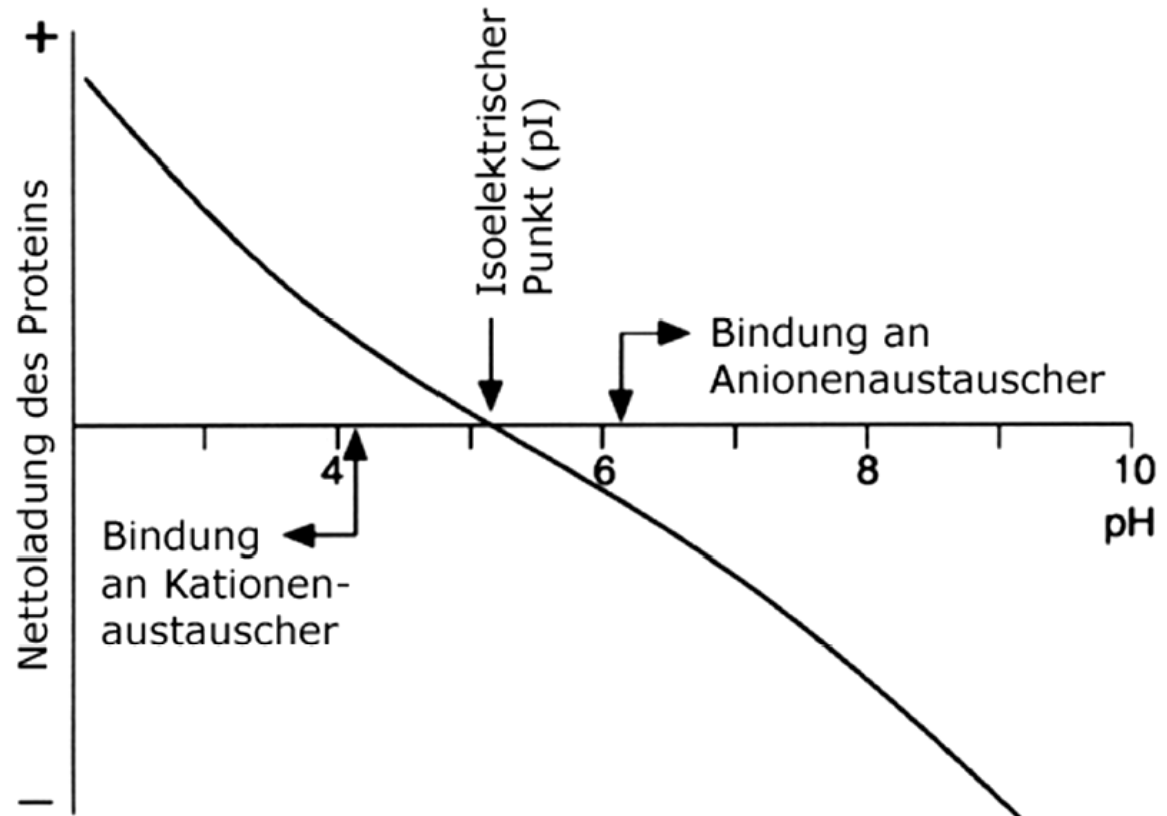


Die Nettoladung eines Proteins in Abhängigkeit des pH-Wertes.



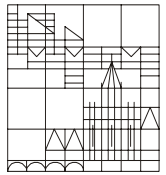
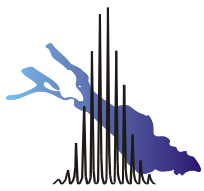
Proteine bestehen aus verschiedenen Aminosäuren, deren Seitenketten neben ungeladenen auch saure und basische Reste tragen können und so zur Gesamtladung des Proteins beitragen.

- Bei niedrigen pH-Werten ist die Gesamtladung wegen der Protonierung der geladenen Seitenketten positiv, bei höheren pH-Werten aufgrund der Deprotonierung negativ.
- Zwischen diesen beiden Zuständen liegt der für jedes Protein charakteristische isoelektrische Punkt (pI). Hier gleichen sich positive und negative Ladungen aus und das Protein erscheint nach außen ungeladen.

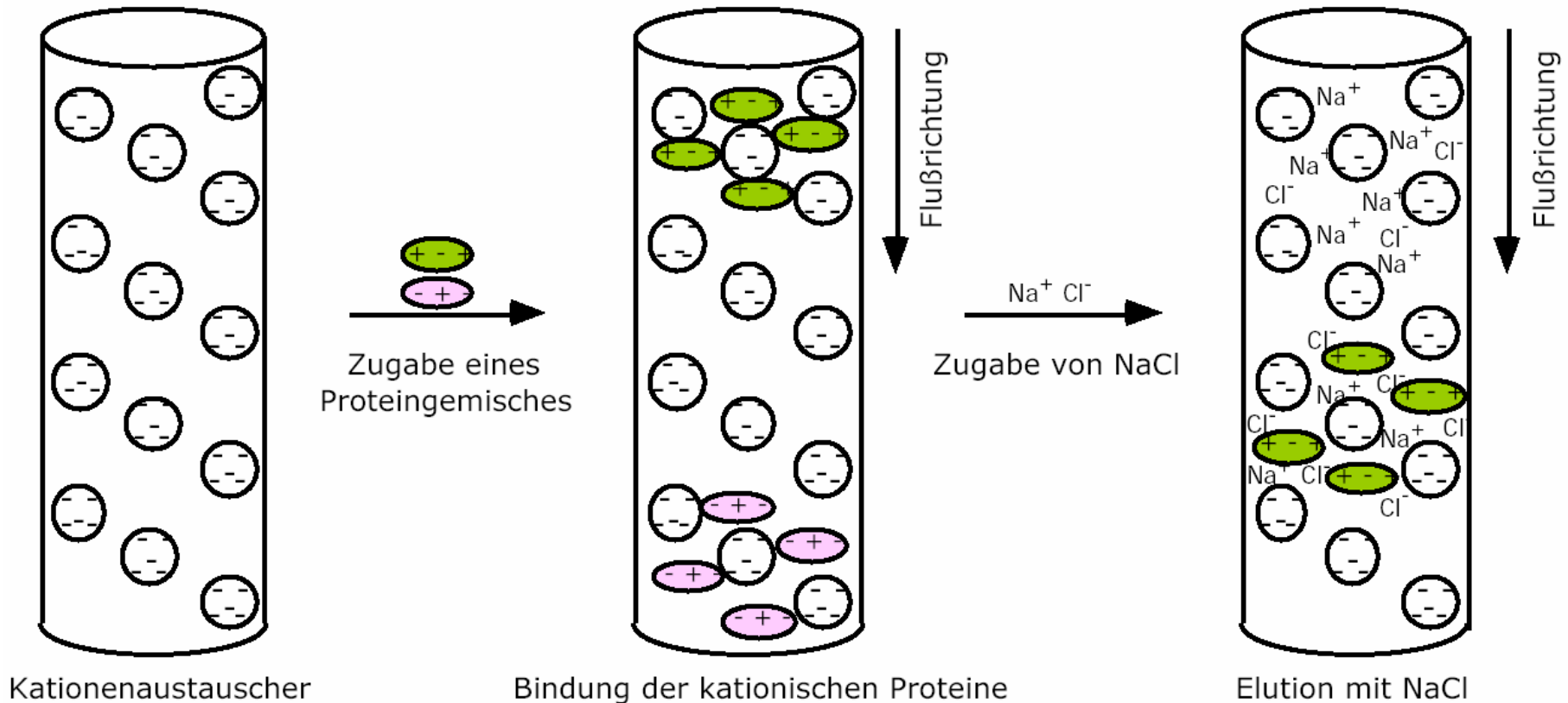


Kationenaustauschchromatographie

Anwendung für Proteine

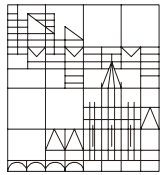
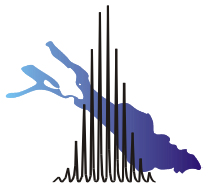


Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch Zugabe von Salzen (NaCl). Durch die Anwesenheit von geladenen Natrium- und Chloridionen werden die elektrostatischen Wechselwirkungen von Proteinen mit der Matrix unterbunden, so dass die Proteine von der Matrix gelöst werden.

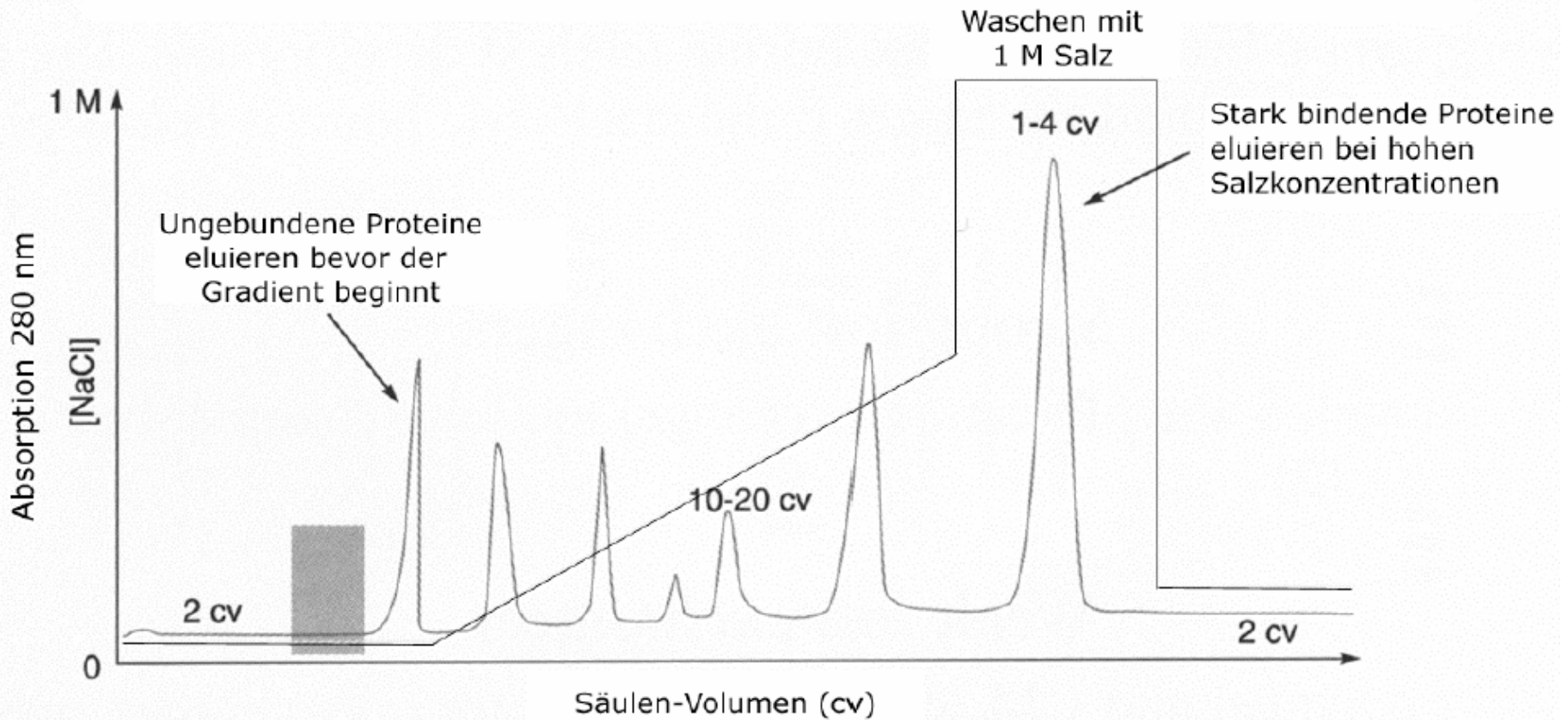


Ionenaustauschchromatographie

Anwendung für Proteine

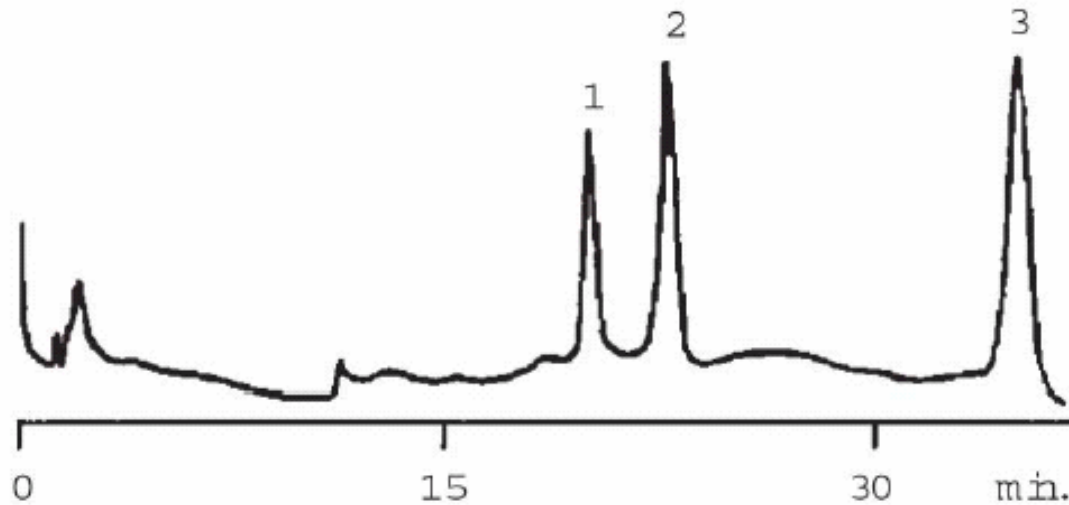
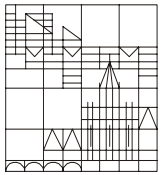
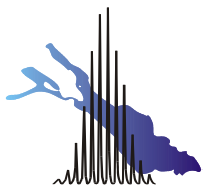


Äquilibrieren → **Probenauftrag** → Gradient Elution → Waschen → Re-Äquilibrieren



Kationenaustauschchromatographie

Anwendung für Proteine



Column: SynChropak SCX, 4.6 x 100 mm, 6.5 μm

Mobile Phase: A: 0.02 M tris, pH 7

B: 0.02 M tris in 0.5M sodium acetate, pH 7

Gradient: 0 – 100% B in 30 min.

Flow Rate: 1.0 mL/min

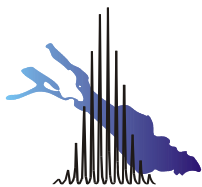
Detection: UV 254 nm

Sample: Basic proteins

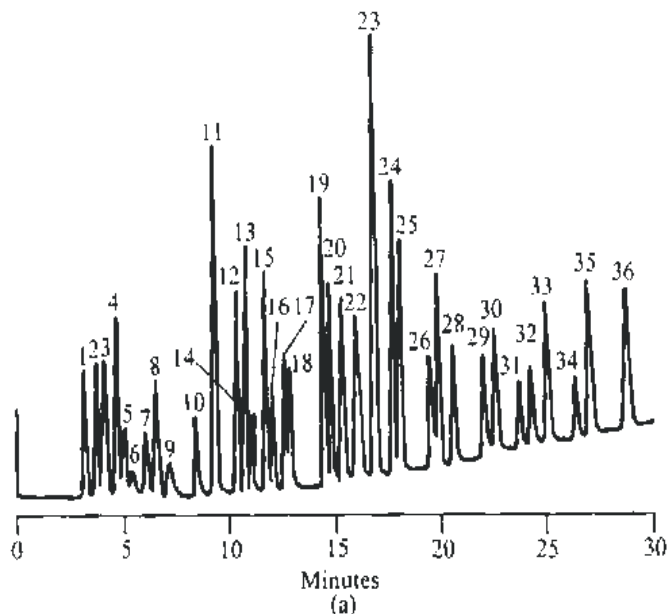
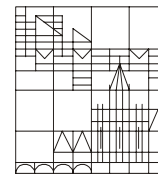
1. RNA polymerase

2. Chymotrypsinogen

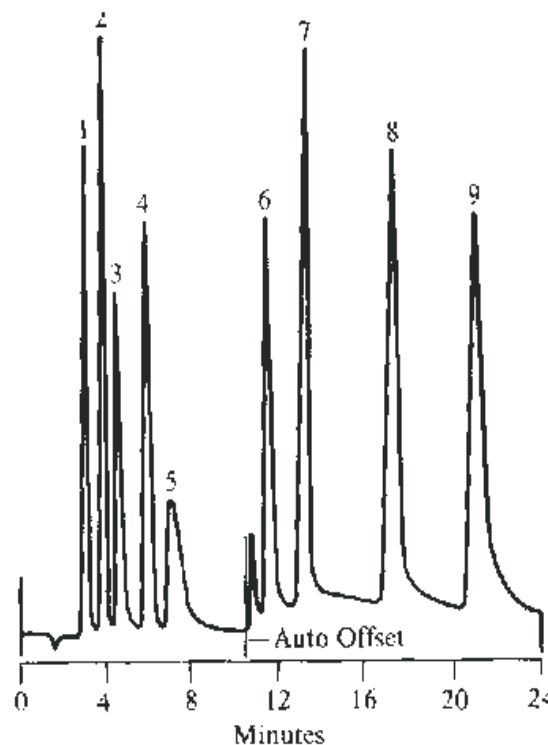
3. Lysozyme



Anwendungsbeispiel für die Ionenaustausch-HPLC



- | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 1. F (1.5 ppm) | 10. Pyruvate | 19. HPO_4^{2-} | 28. Phthalate |
| 2. α -Hydroxybutyrate | 11. Monochloroacetate | 20. SeO_3^{2-} | 29. Oxalacetate |
| 3. Acetate | 12. BrO_3^- | 21. Br^- | 30. PO_4^{3-} |
| 4. Glycolate | 13. Cl (3 ppm) | 22. NO_3^- | 31. AsO_4^{3-} |
| 5. Butyrate | 14. Galacturonate | 23. SO_4^{2-} | 32. CrO_4^{2-} |
| 6. Gluconate | 15. NO_2^- (5 ppm) | 24. Oxalate | 33. Citrate |
| 7. α -Hydroxyvalerate | 16. Glucuronate | 25. SeO_3^{2-} | 34. Isocitrate |
| 8. Formate (5 ppm) | 17. Dichloroacetate | 26. α -Ketoglutarate | 35. cis-Aconitate |
| 9. Valerate | 18. Trifluoroacetate | 27. Fumarate | 36. trans-Aconitate |



	ppm
1. Li^+	.5
2. Na^+	2
3. NH_4^+	3
4. K^+	3
5. Morpholine	30
6. Cyclohexylamine	10
7. Mg^{2+}	1
8. Ca^{2+}	2
9. Sr^{2+}	10

Trennung auf Anionenaustauscher

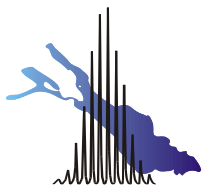
Gradient Eluent: 0.00075 – 0.85 M NaOH

Detektion: Konduktivitätsmessung

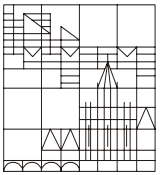
Trennung auf Kationenaustauscher

Eluent: HCl und andere Säuren

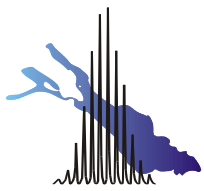
Detektion: Konduktivitätsmessung



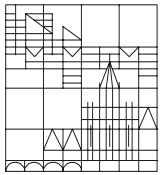
Grundlagen der Affinitätschromatographie



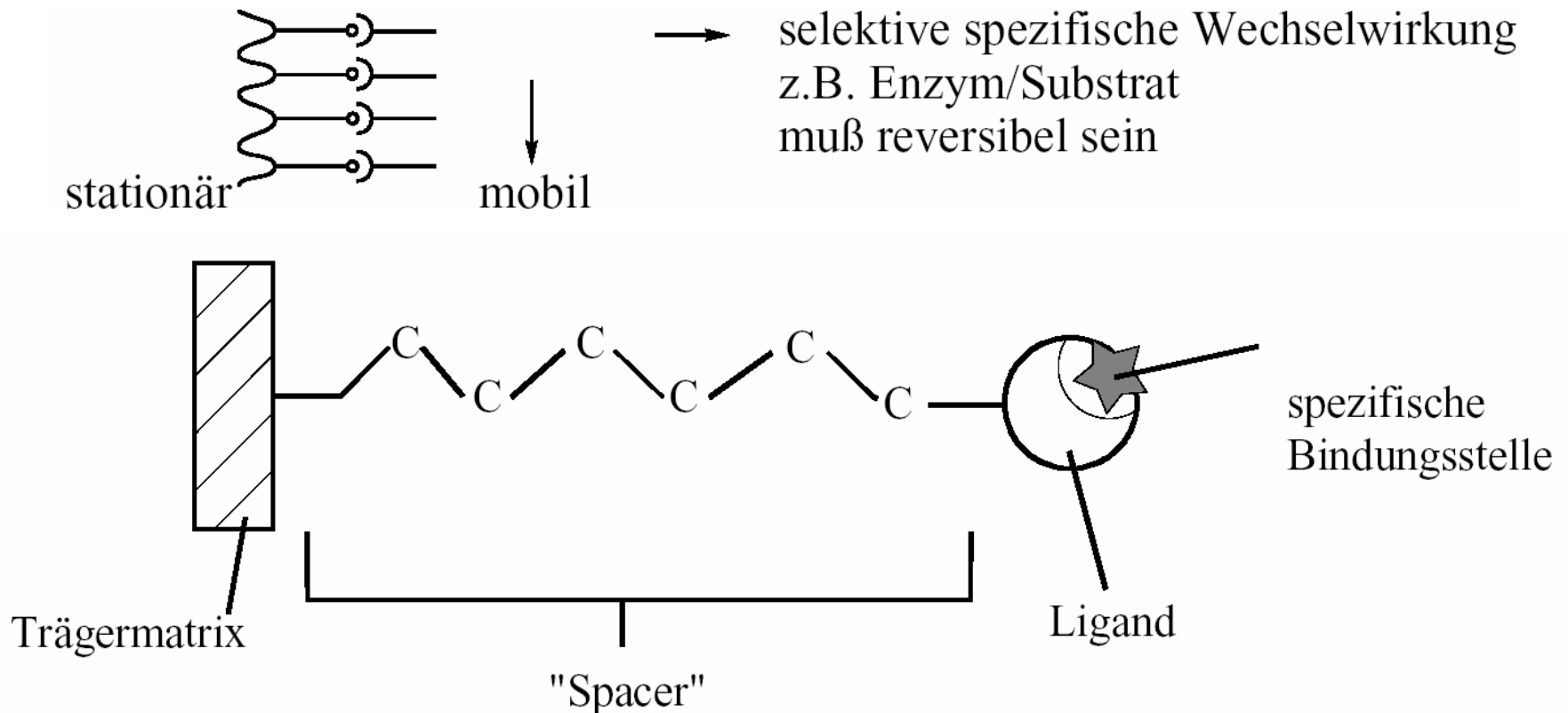
- Immobilisierung eines spezifischen Liganden, der nicht-kovalent, spezifisch und stark an das zu reinigende Protein bindet (z.B. Substrat, Inhibitor, Antikörper etc.)
- Die Elution erfolgt mit kompetitierenden Liganden oder durch Veränderung der Pufferzusammensetzung
- **Vorteil:** An Stelle kleiner physikalischer Unterschiede zwischen verschiedenen Molekülen werden die spezifischen Eigenschaften eines Moleküls ausgenutzt
- **Nachteil:** Die Affinitätschromatographiematrix muss oft selbst hergestellt werden; kleine Liganden müssen über längere Linker fixiert werden (synthetischer Aufwand)

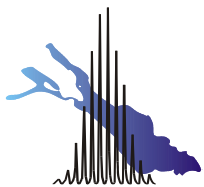


Affinitäts-Chromatographie

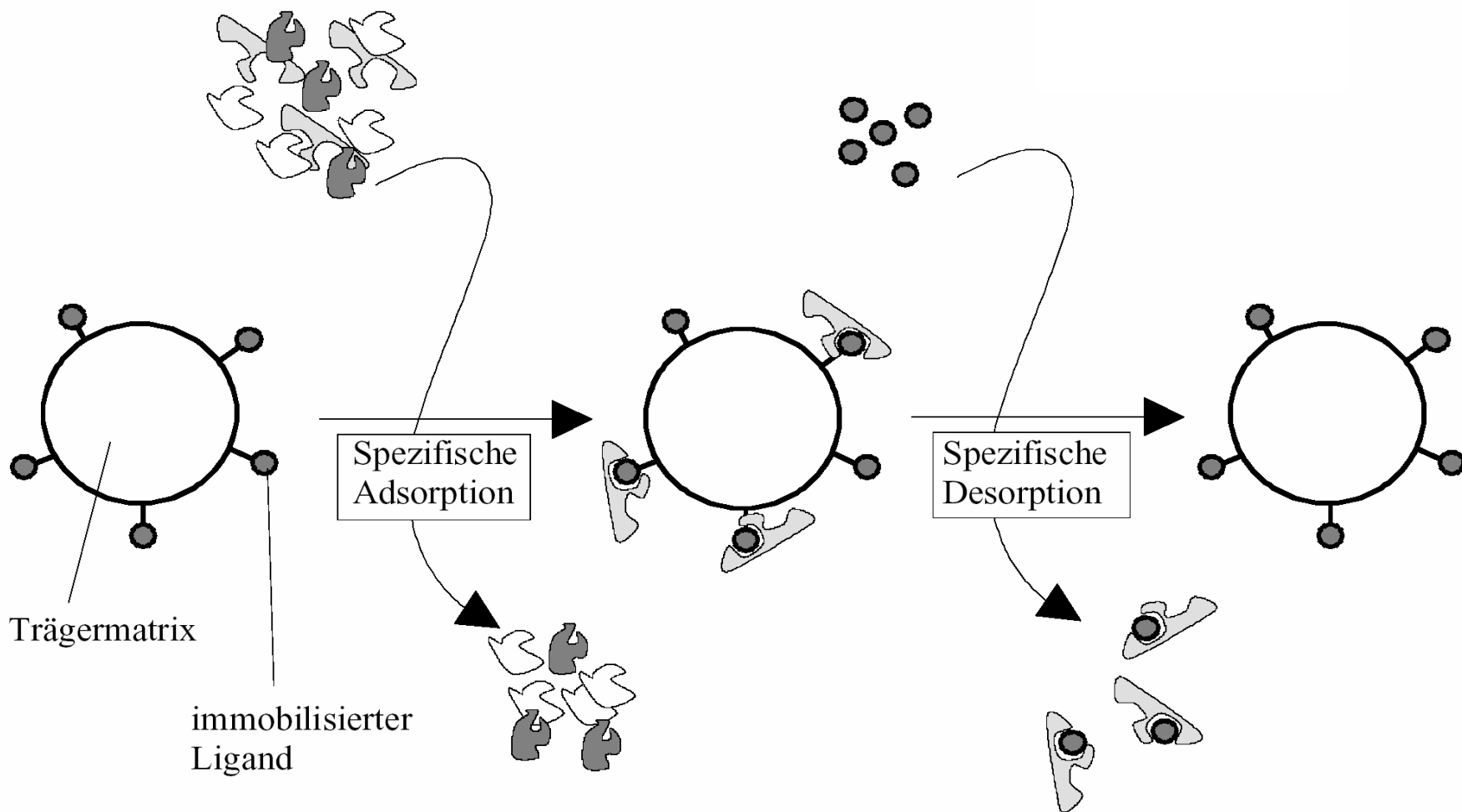
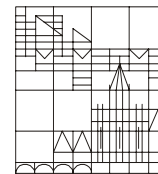


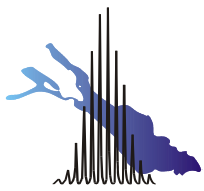
Ausnutzung der spezifischen reversiblen Interaktion eines Proteins mit spezifischen Liganden (z.B. zwischen Antikörper und Antigen, Enzym und Substrat, Enzym und Coenzym).



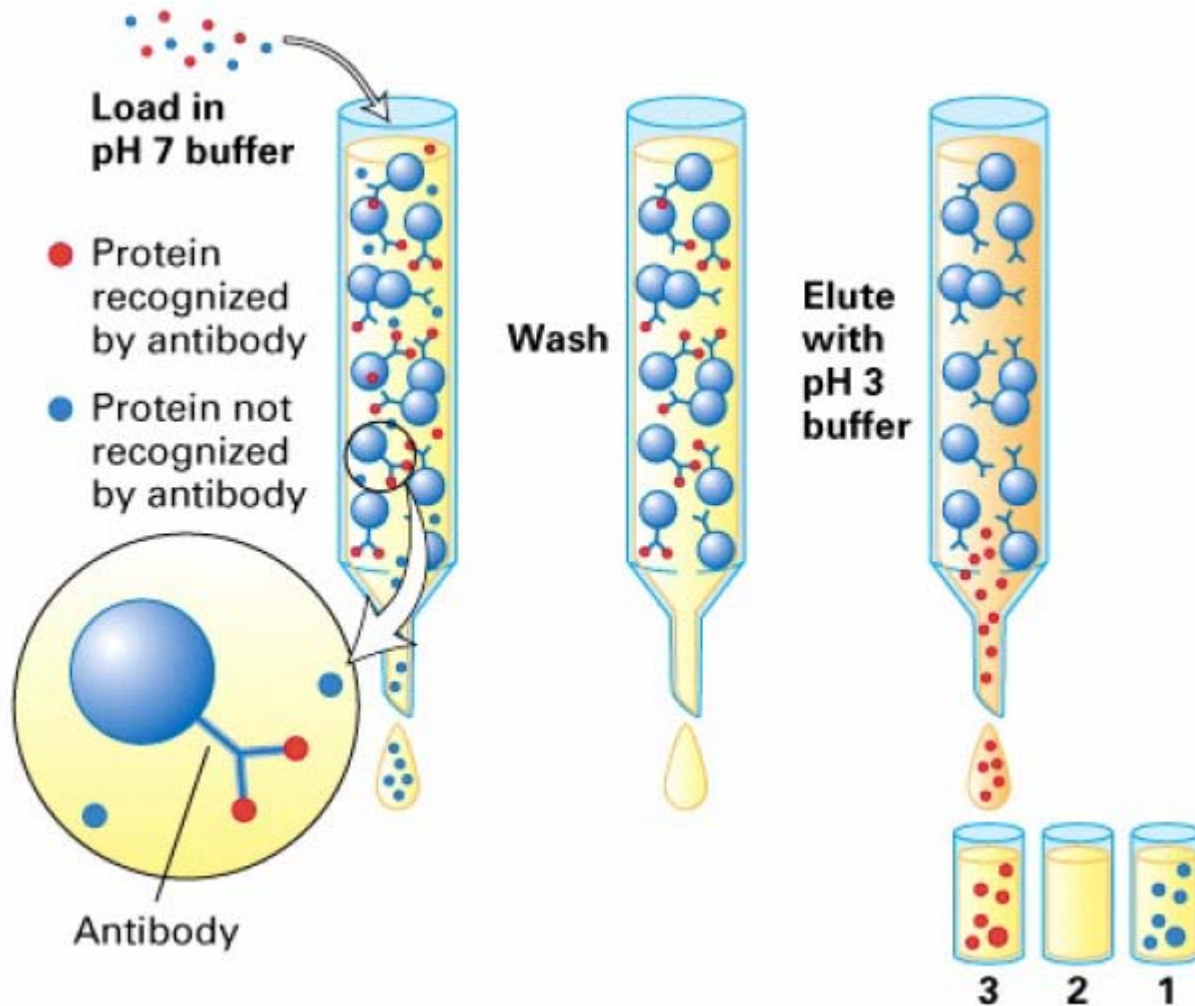
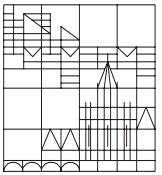


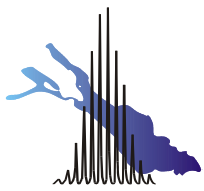
Affinitätschromatographie (Prinzip)



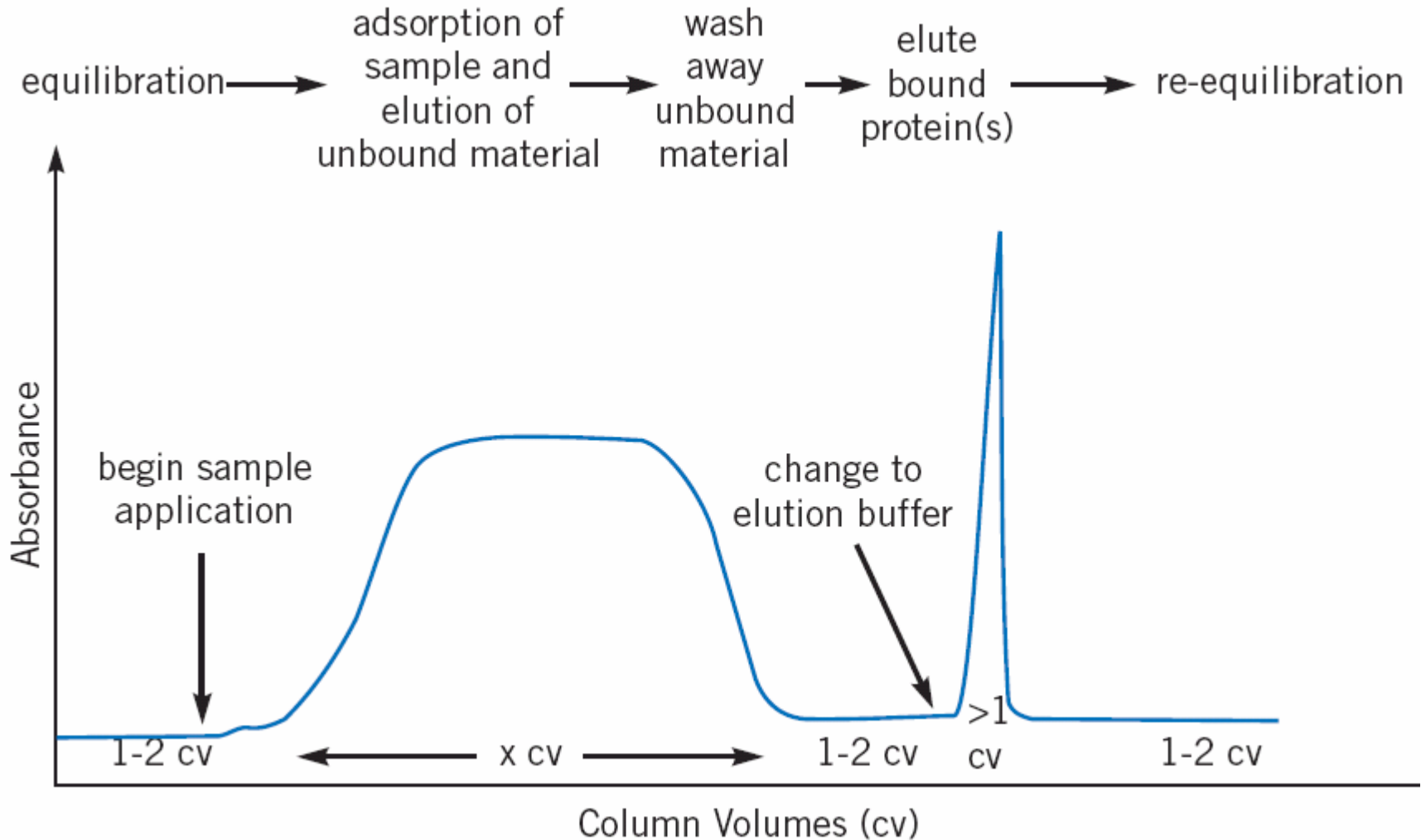
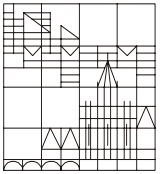


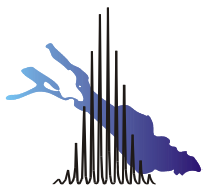
Affinitäts-Chromatographie



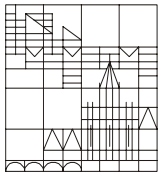


Affinitäts-Chromatographie



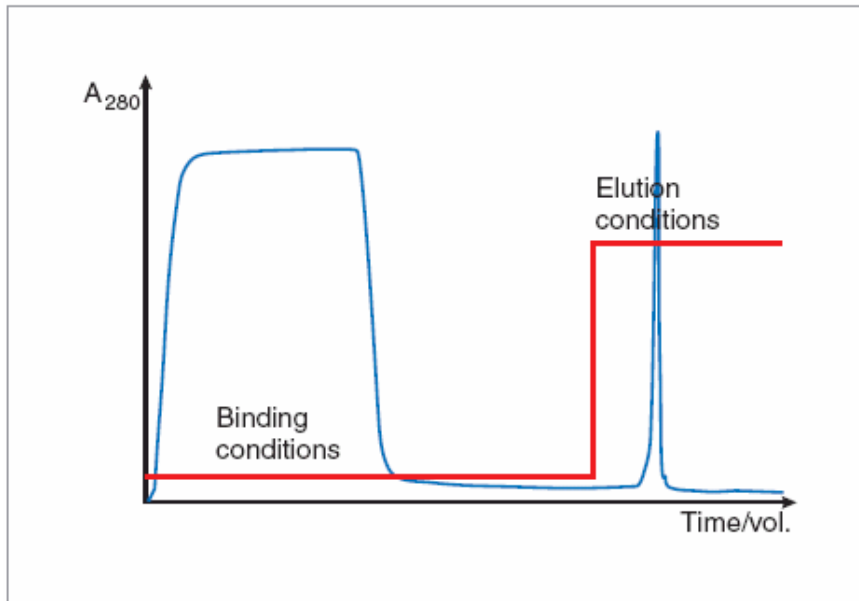


Elutionsverfahren bei der Affinitätschromatographie

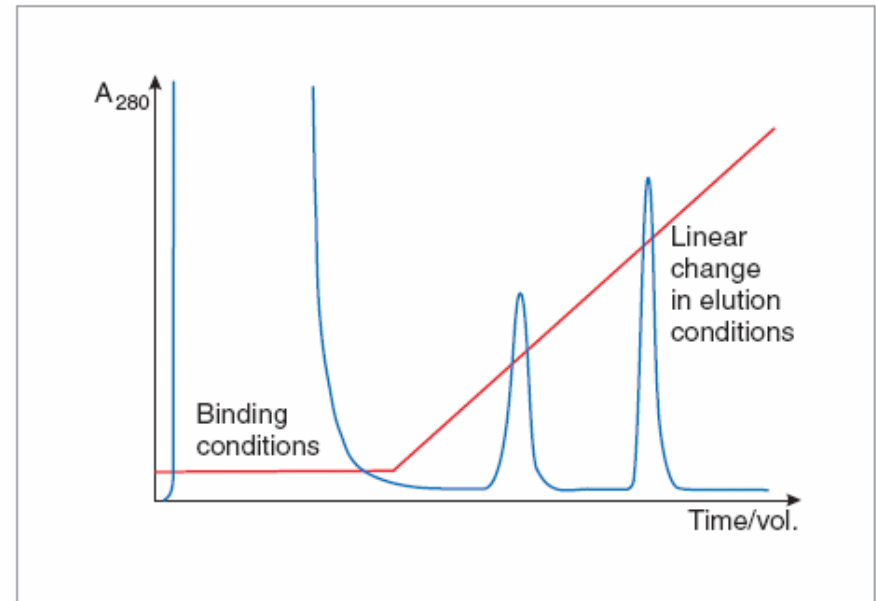


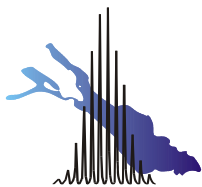
Stufen- und Gradientenelution

Stufenelution

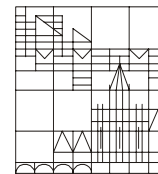


Gradientenelution





Affinitäts-Chromatographie

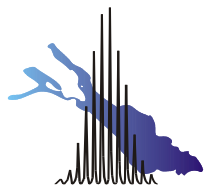


Gruppenspezifische Liganden

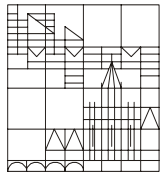
Lectine	Glycoproteine
Protein A	IgG
Protein G	IgG
Heparin	Coagulationproteine
Calmodulin	Ca ²⁺ -bindende Proteine
Farbstoff	Enzym
Nucleinsäuren	Dehydrogenasen, Kinasen

Monospezifische Liganden

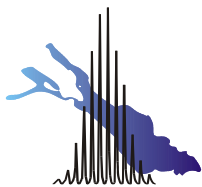
Antikörper	Antigene
Enzyminhibitoren	Enzyme
MBP- or GST-Antikörper	recombinante (Fusions-)Proteine
Hormone	Rezeptoren



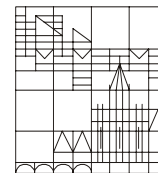
Bindungsaffinitäten von Protein A und G



	Protein A	Protein G		Protein A	Protein G
Human IgG1	✓✓✓✓	✓✓✓✓	Kaninchen IgG	✓✓✓✓	✓✓✓
Human IgG2	✓✓✓✓	✓✓✓✓	Hamster IgG	✓	✓✓
Human IgG3	x	✓✓✓✓	Meerschweinchen IgG	✓✓✓✓	✓✓
Human IgG4	✓✓✓✓	✓✓✓✓	Bovine IgG	✓✓	✓✓✓✓
Human IgA	✓✓	x	Schaf IgG	✓/x	✓✓
Human IgD	✓✓	x	Ziegen IgG	✓/x	✓✓
Human IgE	✓✓	x	Schweine IgG	✓✓✓	✓✓✓
Human IgM	✓✓	x	Hühner IgG	x	✓
Maus IgG1	✓	✓✓			
Maus IgG2a	✓✓✓✓	✓✓✓✓	Fragmente		
Maus IgG2b	✓✓✓	✓✓✓	Human Fab	✓	✓
Maus IgG3	✓✓	✓✓✓	Human F(ab') ₂	✓	✓
Maus IgM	✓/x	x	Human scFv	✓	x
Ratten IgG1	x	✓	Human Fc	✓✓	✓✓
Ratten IgG2a	x	✓✓✓✓	Human κ	x	x
Ratten IgG2b	x	✓✓	Human λ	x	x
Ratten IgG2c	✓	✓✓			
Ratten IgM	✓/x	x			



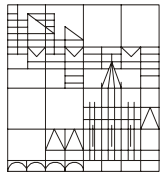
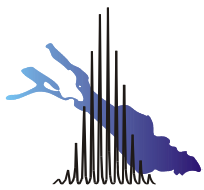
Affinitätssäulen



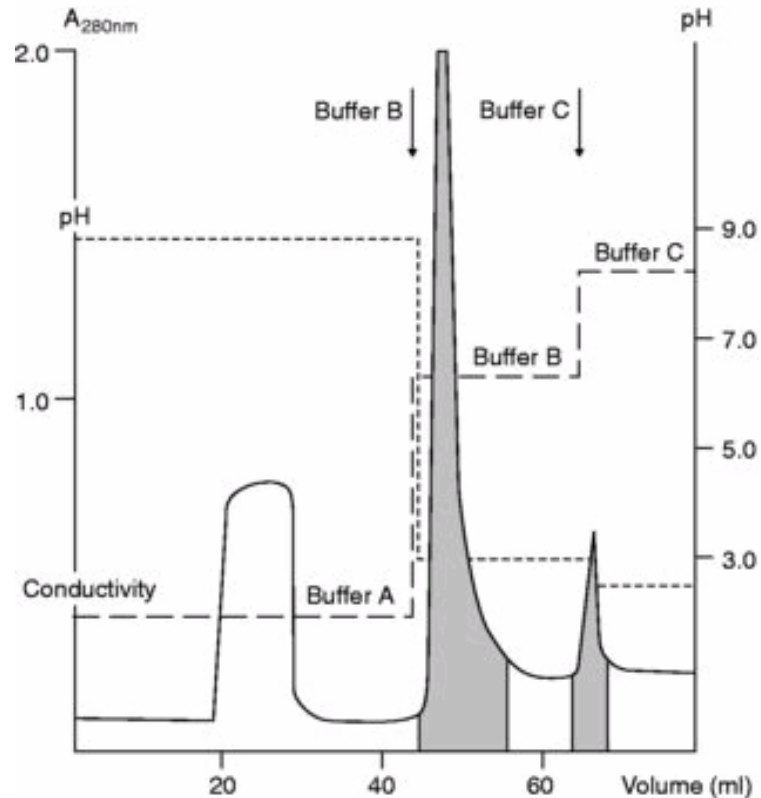
HiTrap and HiPrep™ affinity columns

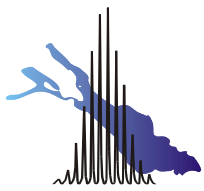
Application	HiTrap and HiPrep columns
Isolation of human immunoglobulins	
IgG, fragments and subclasses	HiTrap rProtein A FF, 1 ml and 5 ml
IgG, fragments and subclasses	HiTrap Protein A HP, 1 ml and 5 ml
IgG, fragments and subclasses including human IgG ₃ strong affinity for monoclonal mouse IgG ₁ and rat IgG	HiTrap Protein G HP, 1 ml and 5 ml MAbTrap™ Kit
Avian IgY from egg yolk	HiTrap IgY Purification HP, 5 ml
Mouse and human IgM	HiTrap IgM Purification HP, 1 ml
Purification of fusion proteins	
(His) ₆ fusion proteins	HisTrap™ Kit HiTrap Chelating HP, 1 ml and 5 ml
GST fusion proteins	GSTrap™ FF, 1 ml and 5 ml GSTPrep™ FF 16/10, 20 ml
Other Group Specific Media	
Albumin and nucleotide-requiring enzymes	HiTrap Blue HP, 1 ml and 5 ml
Proteins and peptides with exposed His, Cys or Trp	HiTrap Chelating HP, 1 ml and 5 ml
Biotinylated substances	HiTrap Streptavidin HP, 1 ml
DNA binding proteins and coagulation factors	HiTrap Heparin HP, 1 ml and 5 ml HiPrep 16/10 Heparin FF, 20 ml
Trypsin-like serine proteases including Factor Xa, thrombin and trypsin	HiTrap Benzamidine FF (high sub), 1 ml and 5 ml
Matrix for preparation of affinity media. Coupling via primary amines	HiTrap NHS-activated HP, 1 ml and 5 ml

Affinitätschromatographie Beispiel: Antikörperreinigung

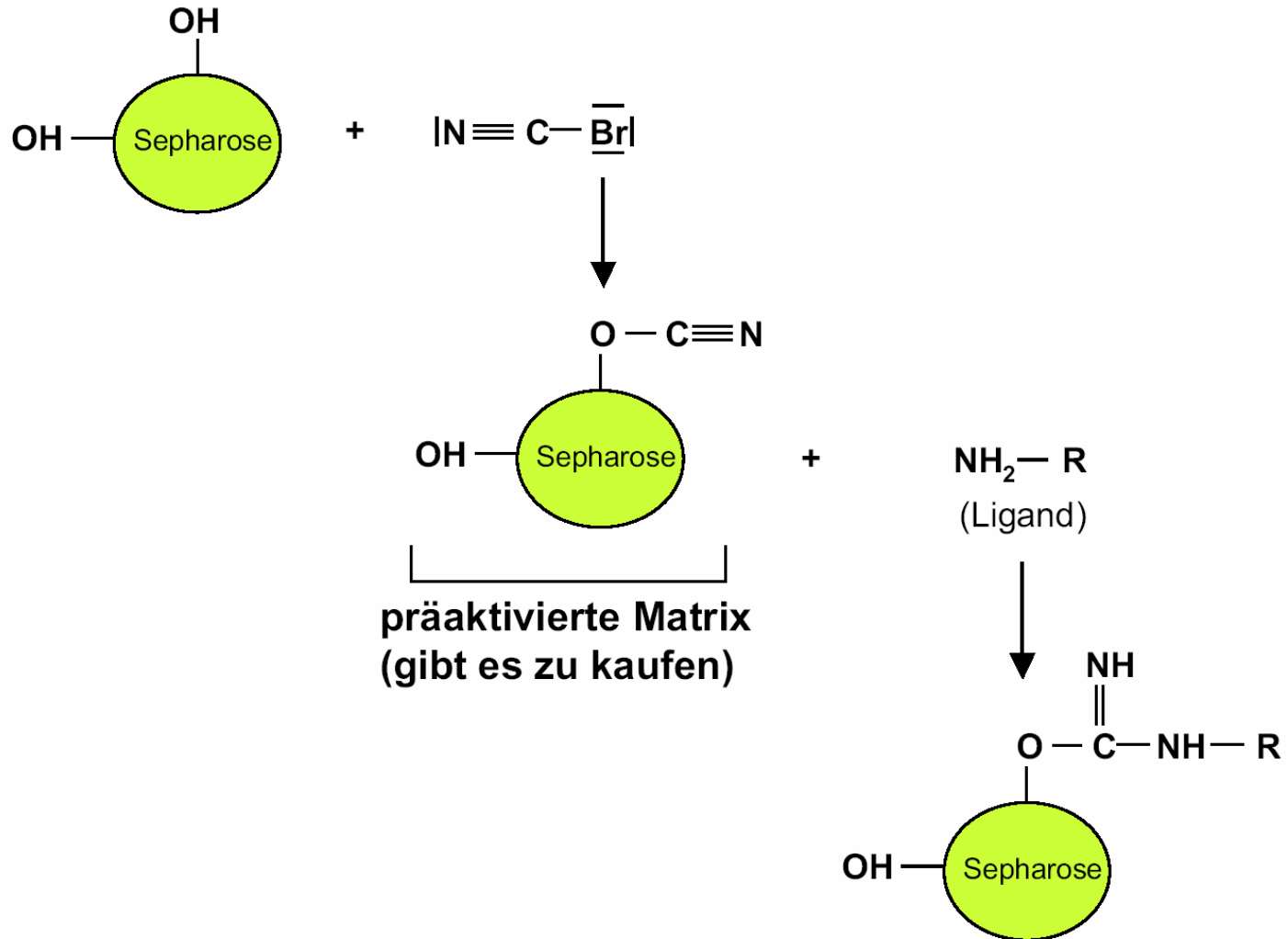
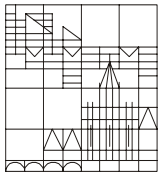


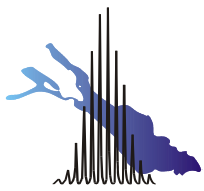
Gel: Protein G Sepharose 4 Fast Flow
Column dimensions: 0.9 × 1.1 cm
Sample: 14 ml of concentrated partially purified human monoclonal antibody from a CM Sepharose Fast Flow chromatography step
Binding buffer (A): 0.1 M glycine, pH 9.0
Elution buffer (B): 0.1 M glycine, pH 3.0
Elution buffer (C): 0.1 M glycine, pH 2.5



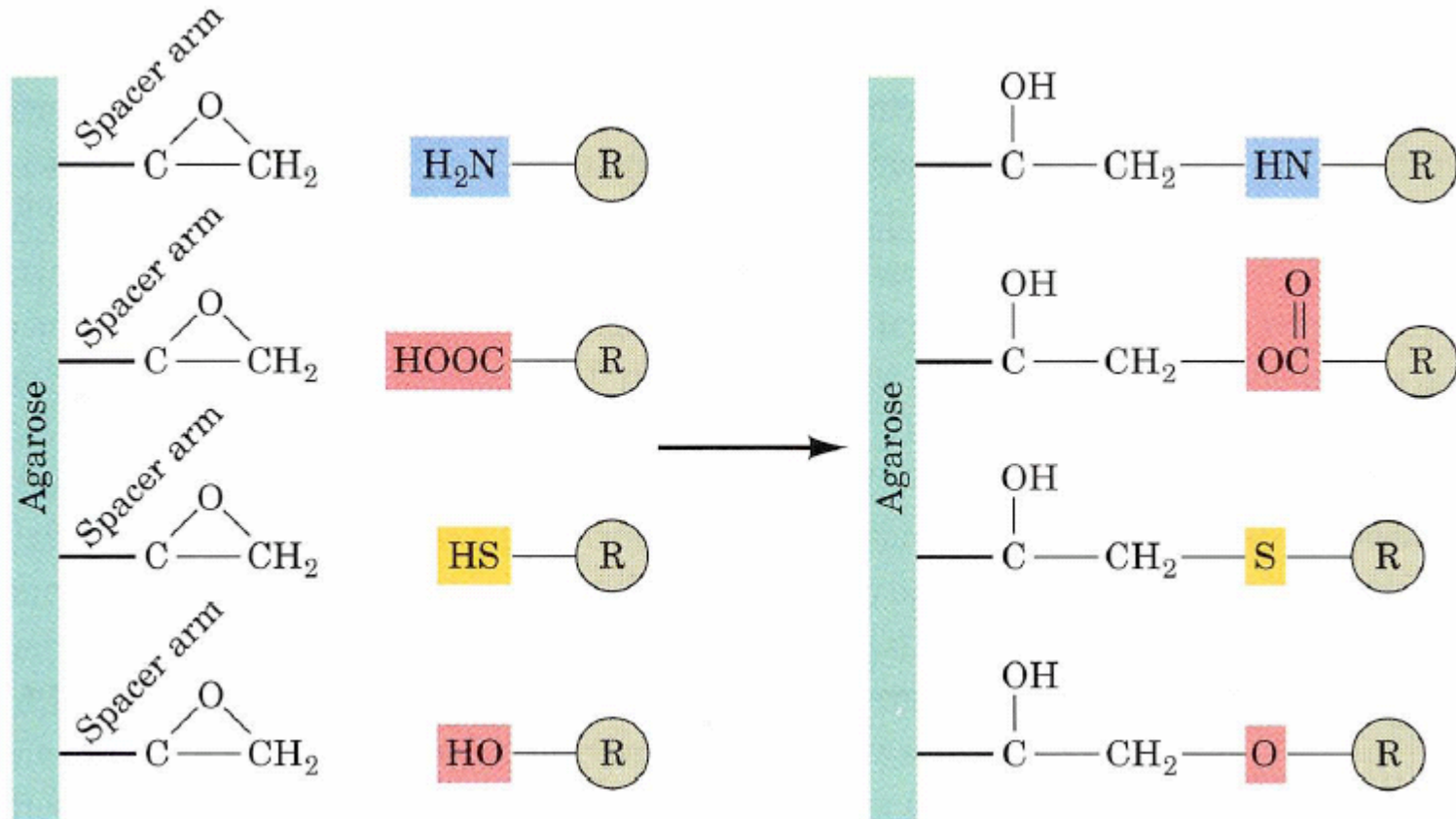
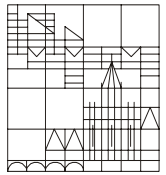


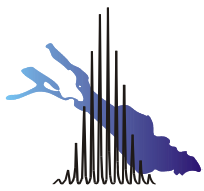
Ligandenkopplung über Cyanogen-aktivierte Sepharose



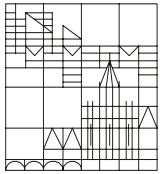


Ligandenkopplung über Epoxy-aktivierte Sepharose



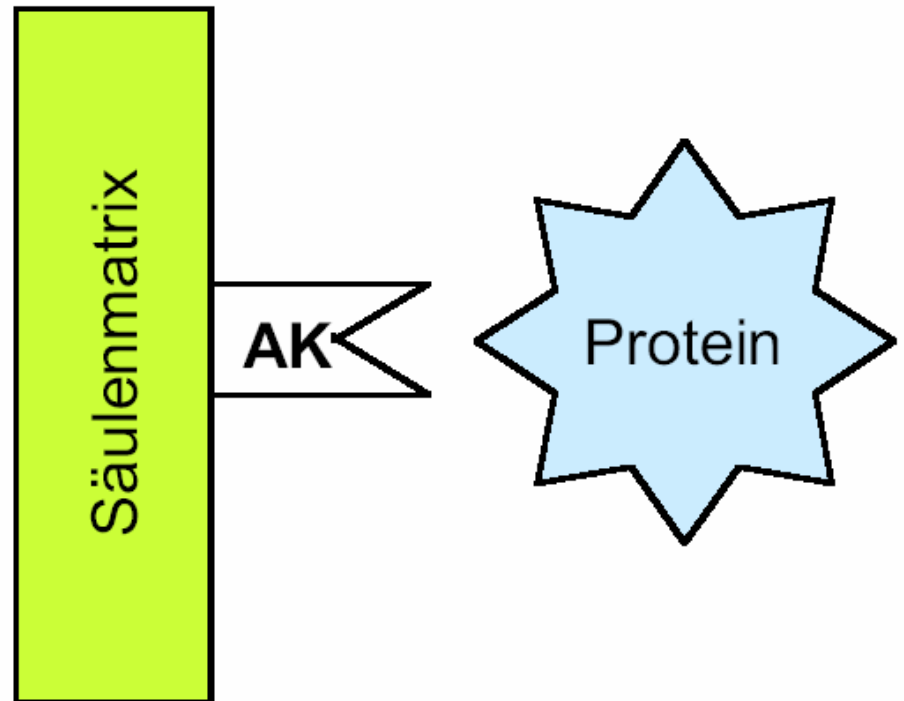


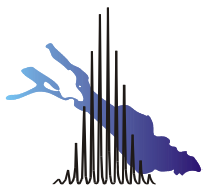
Affinitäts-Chromatographie



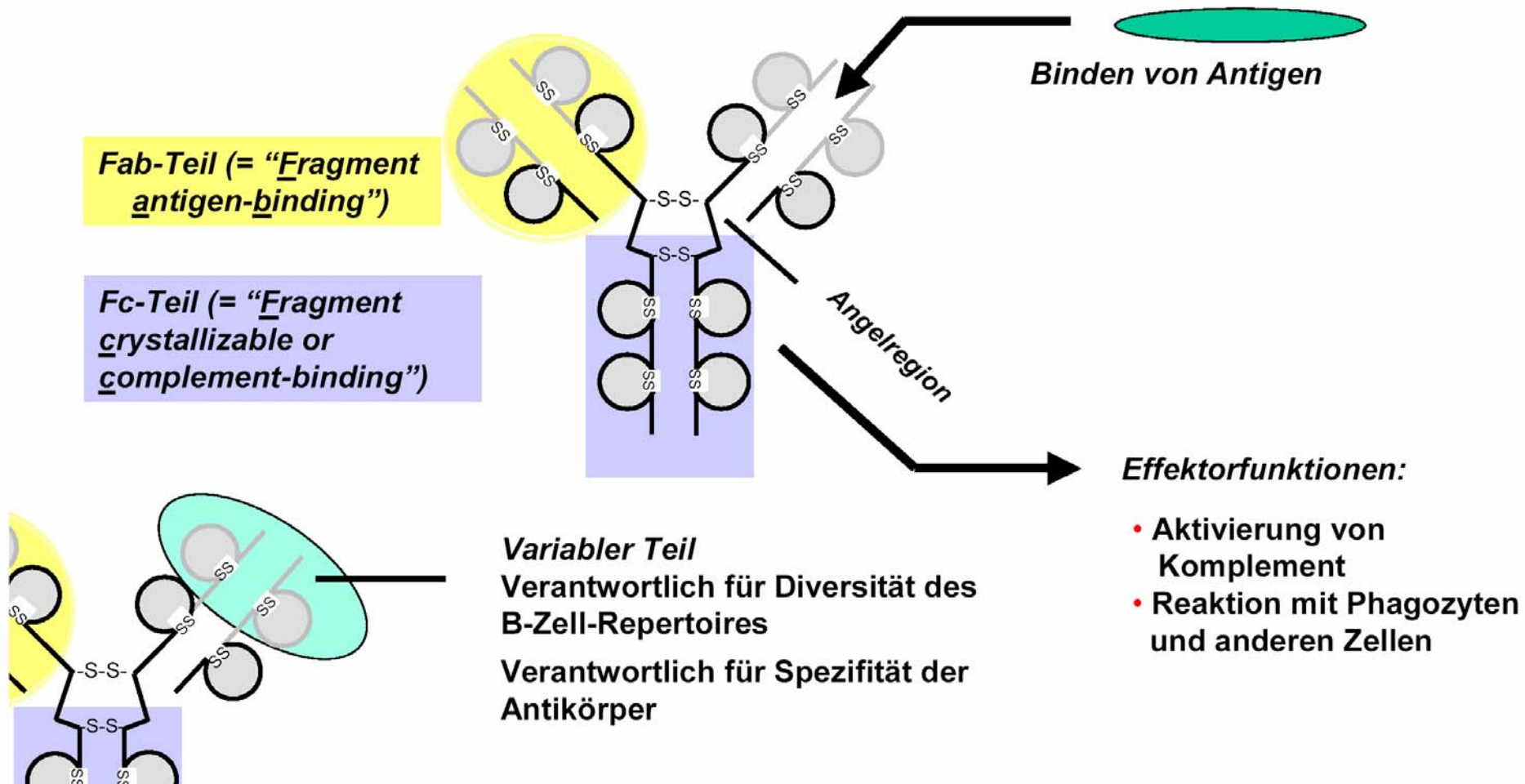
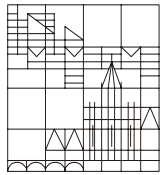
Die Verwendung von spezifischen Antikörpern für die Reinigung eines Proteins

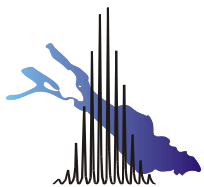
Nachteil: man muss schon einen Antikörper gegen das Protein haben, das man reinigen will.



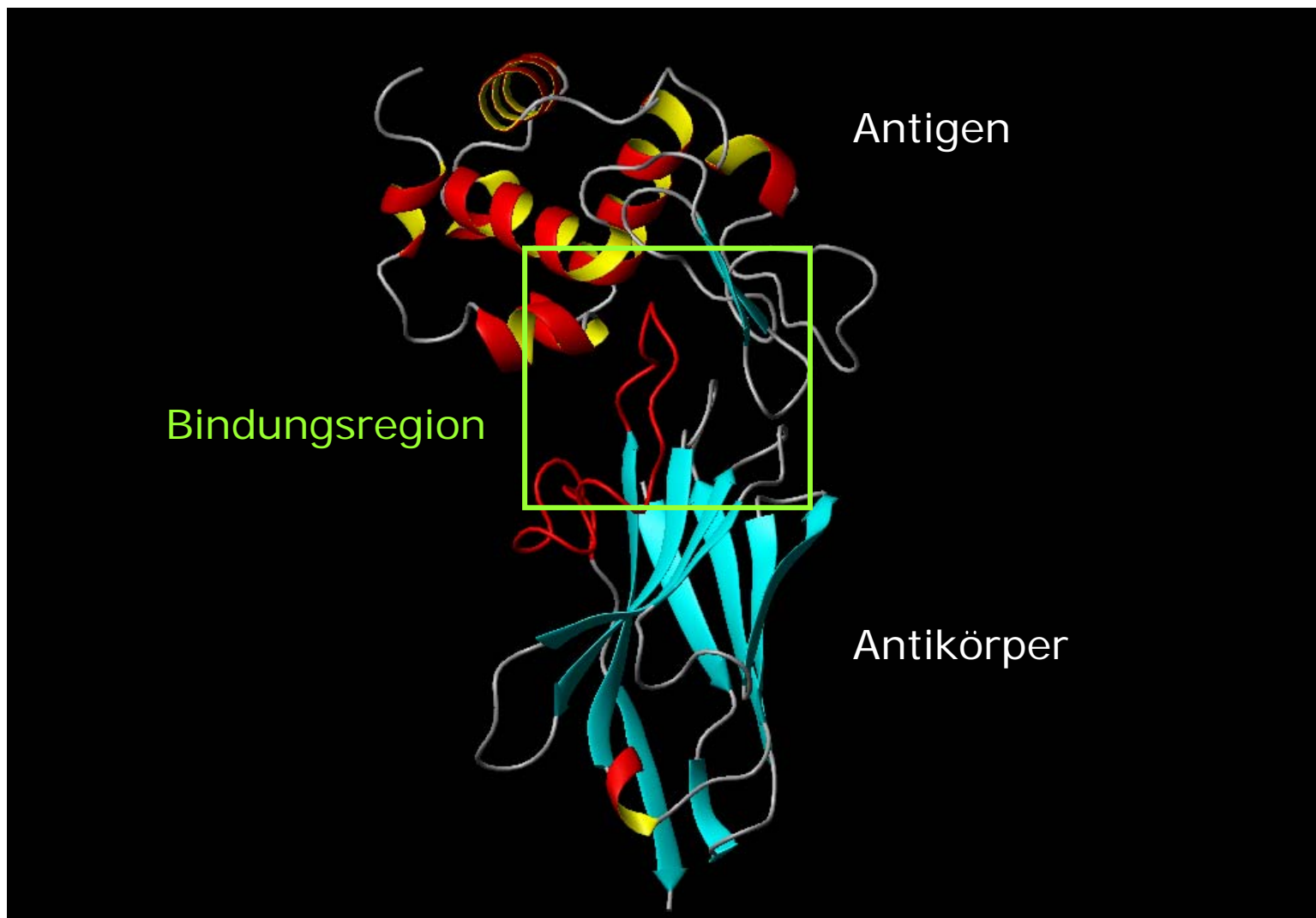
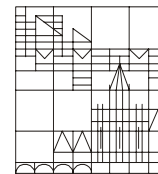


Schematischer Aufbau eines Antikörpers

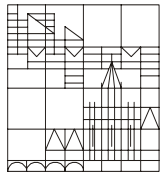
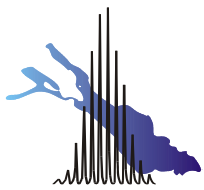




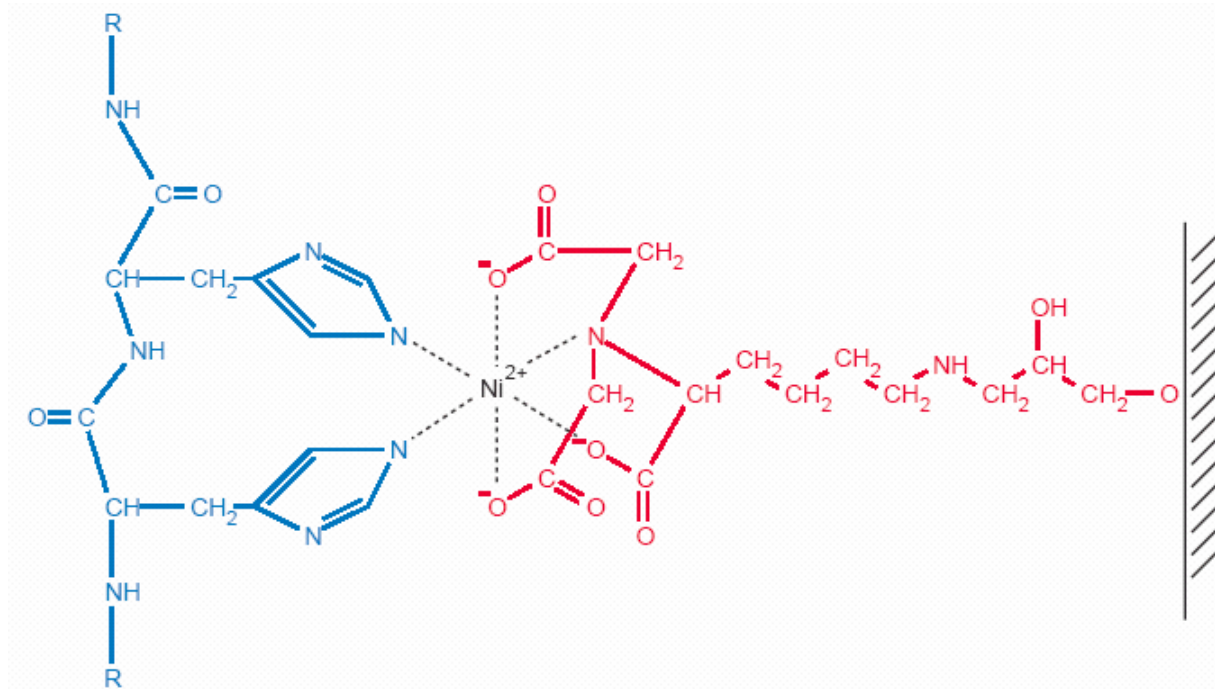
Antigen-Antikörper-Komplex



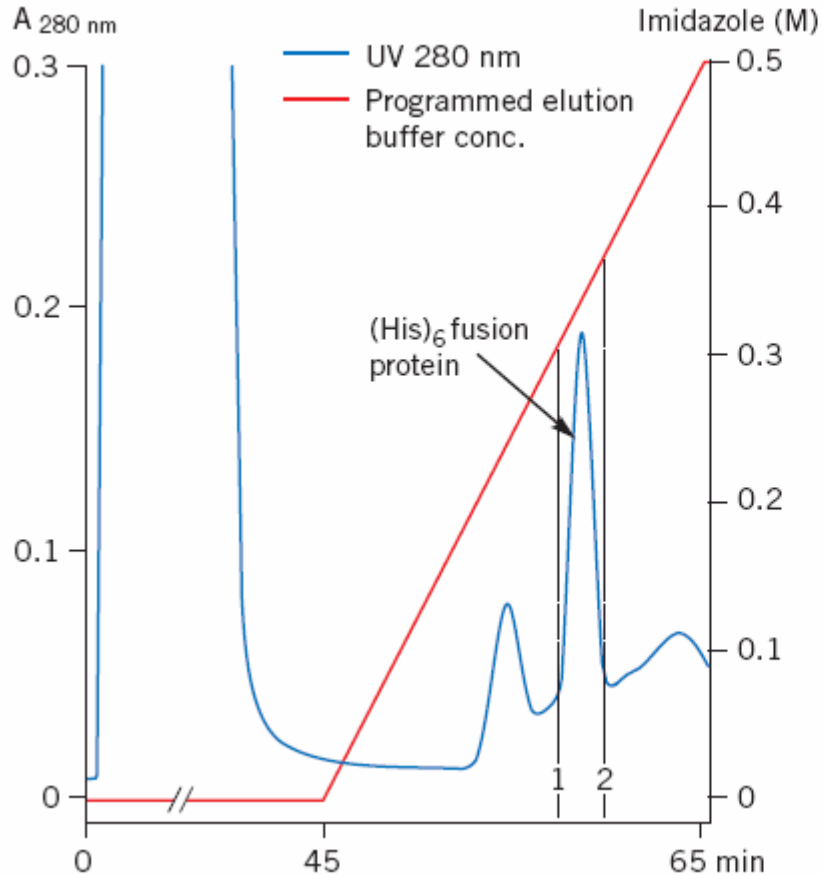
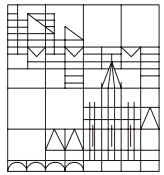
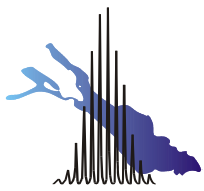
Reinigung rekombinanter Proteine durch Ni^{2+} -NTA-Agarose



- Protein hat 5-6 Histidine am C-Terminus oder am N-Terminus
- Diese Histidine interagieren mit Nickelionen, die an der Gelmatrix binden
- Elution mit saurem Puffer oder Imidazol



Reinigung rekombinanter Proteine durch Ni²⁺-NTA-Agarose



Sample: Clarified homogenate of *E. coli* expressing His fusion protein

Column: HiTrap Chelating HP 1 ml column charged with Ni²⁺

Binding buffer: 20 mM sodium phosphate, 0.5 M sodium chloride, 10 mM imidazole, pH 7.4

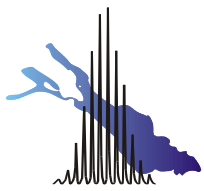
Elution buffer: 20 mM sodium phosphate, 0.5 M sodium chloride, 0.5 M imidazole, pH 7.4

Flow: 1 ml/min

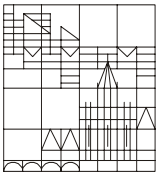
System: ÄKTAprime

1: selected imidazole concentration for elution of impurities

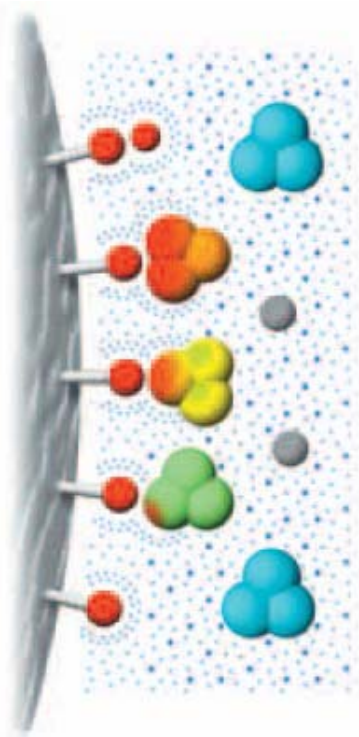
2: selected imidazole concentration for elution of pure (His)₆ fusion protein



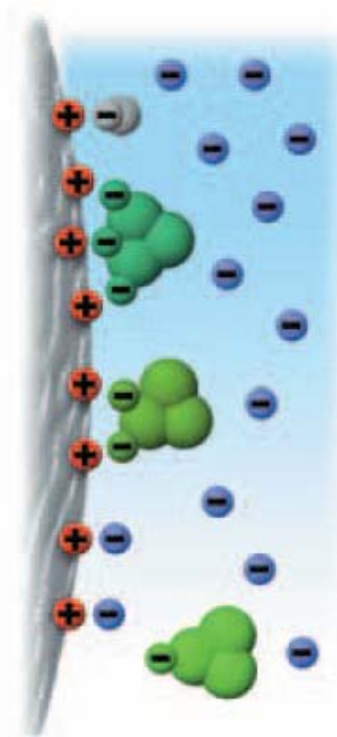
Vergleich verschiedener Trennprinzipien



Gel filtration



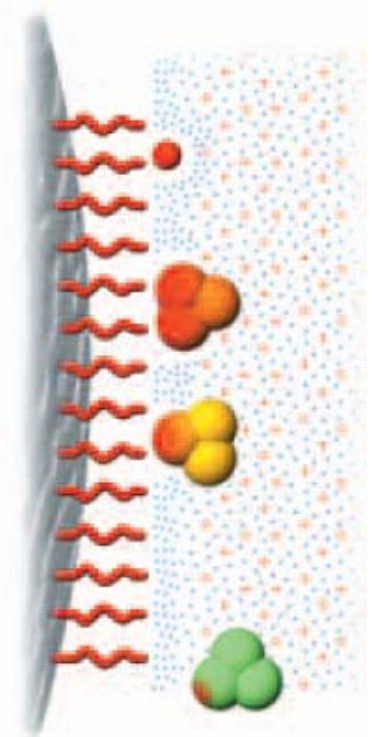
Hydrophobic interaction



Ion exchange



Affinity



Reversed phase