

Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen durch Kapillar-HPLC

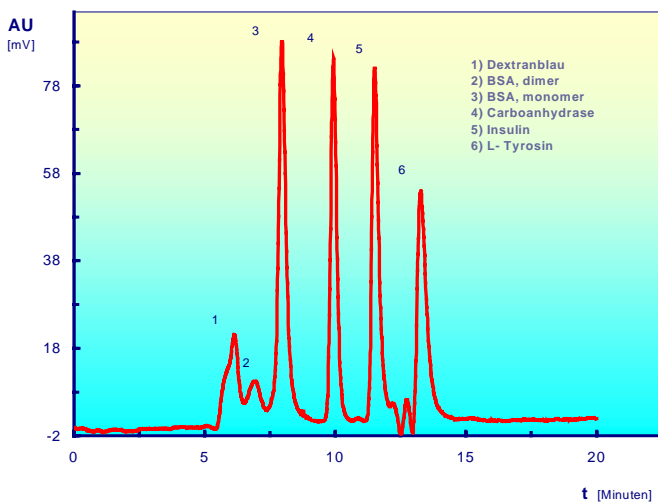
- Sterische Ausschlußchromatographie (SEC) -

In der biochemischen Forschung, speziell bei der Analyse von Proteomen sind Elektrophorese, z.B. in Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), und Flüssigkeitschromatographie von je her zwei sich effizient ergänzende Methoden.

Nachteile elektrophoretischer Techniken sind jedoch der relativ große, notwendige Arbeitsaufwand, Nicht-Detektierbarkeit von Peptiden und

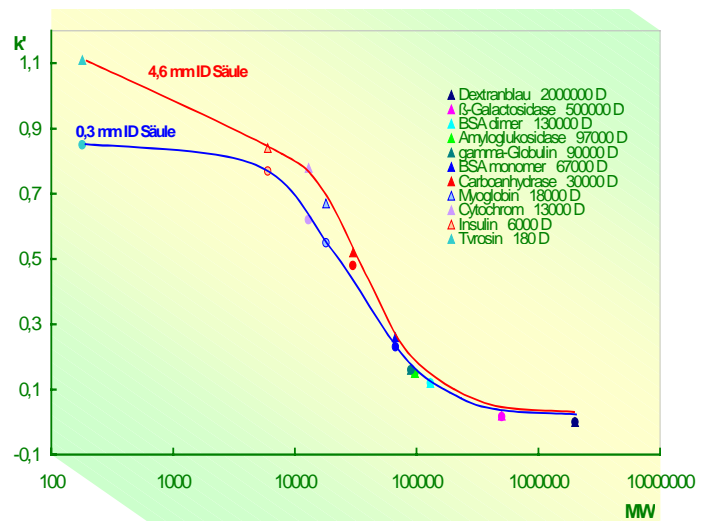
kleineren Proteinen ($\leq 10\ 000\ D$), nur bedingte Reproduzierbarkeit, sowie oft der Verlust der biologischen Aktivität von Enzymen. Diese Nachteile können jedoch leicht durch die Vorteile der HPLC wie einfache Handhabung, Schnelligkeit, leichte Quantifizierbarkeit etc. und zwar bei noch höherer Empfindlichkeit kompensiert werden.

Abb. 1 SEC eines Proteingemisches



Stationäre Phase: TOSOH Super SW 2000; Säulendimension: 300 mm x 0,5 mm; Eluent: 0,1 M Na-Phosphat pH 6,8 - 0,1 M NaCl; Fließgeschwindigkeit: 0,35 mm/s; Temperatur: RT; Detektion: 206 nm (UV); Flusszelle: 4 nL / 0,2 mm; Injektion: 300 nL Proteingemisch (0,1 - 0,4 mg/mL)

Abb. 2 MW-Bestimmung von Proteinen durch SEC



Stationäre Phase: TOSOH Super SW 2000 - 4 μ m Säulendimension: 300 mm x 4,6 mm bzw. 0,3 mm; Eluent: 0,1 M Na-Phosphat pH 6,8 - 0,1 M NaCl; Fließgeschwindigkeit: 0,35 mm/s; Temperatur: RT; Detektor: 206 nm (UV); Flusszelle: 15 μ l / 10 mm bzw. 4 nL / 0,2 mm; Injektion: 10 μ l bzw. 300 nL Proteinlösung (~ 0,1-0,5 mg/mL)

Für den Nachweis eines Proteins durch „silver staining“ auf einem 2-dimensionalen Gel müssen ~2 ng pro Proteinbande aufgetragen werden. Hingegen genügen für die Injektion z.B. auf 300 x 0,3 mm Säule schon etwa 1,5 ng (in einem Probenvolumen von 100 - 300 nL). Dies entspricht einer Nachweisgrenze von weniger als 0,02 ng (≥ 3 -faches Signal/ Rauschverhältnis).

Eine Kapillar-SEC-Säule kann bequem und schnell durch Injektion ein oder zweier Gemische unterschiedlicher Markerproteine (s. Abb. 1) kalibriert werden (s. Abb. 2), und anschließend durch eine weitere Injektion des „Proteins of Interest“ dessen „apparentes“ Molekulargewicht bestimmt werden. (Lit: C. Klein, P. Földi, LaborPraxis, 02, 34-38 (2002).