

Lösung der Probleme: die SDS-PAGE

Aufgrund der vorhin beschriebenen Probleme, wäre es schön, wenn man alle zu untersuchende Proteine **entfalten** (=denaturieren) und **proportional zu ihrer Größe laden** könnte („Gleichberechtigung“, so wie bei den Nukleinsäuren).

Und das schafft man durch die Behandlung (5 min bei 95°C) mit dem Detergenz SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat).

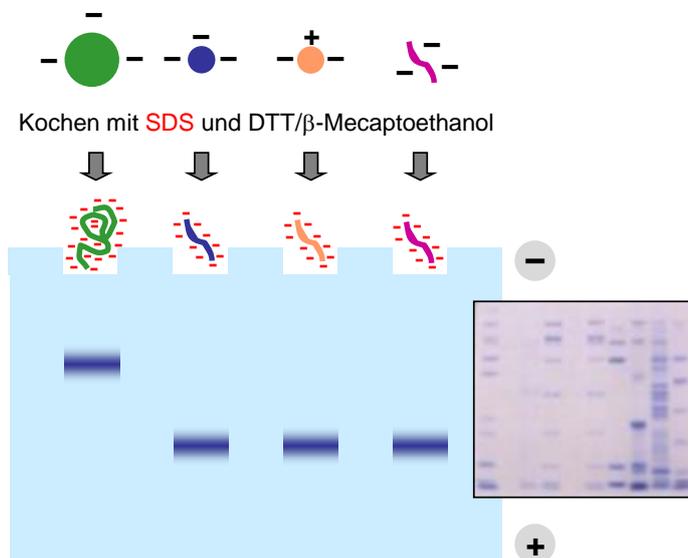
Durch das **Kochen** werden nicht-kovalente Proteinaggregate (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) aufgelöst*. **SDS** lagert sich dann an die gestreckten Proteine an und besetzt die Oberfläche gleichmäßig mit negativen Ladungen.

* **Kovalente Bindungen** (z.B. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen) können durch Zugabe von **reduzierenden Thiolverbindungen** wie β -Mercaptoethanol oder DTT (Dithiothreitol) ebenfalls zerstört werden.

Nach dieser Behandlung sind alle Proteine entfaltet und haben eine Nettoladung, die proportional zur Molekülgröße (und damit proportional zum Molekulargewicht) ist. SDS-beladene Moleküle lassen sich dann ähnlich trennen wie Nukleinsäuren.

kontinuierliche, denaturierende PAGE

Auftrennung nach Größe (Molekulargewicht)



Durch unterschiedliche Taschentiefe, Ungleichmäßigkeiten bei der Befüllung der Taschen bzw. beim Einlaufen der Proteine in das Gel, sind die Proteinbanden meist **unscharf**. Dasselbe Problem ergibt sich bei großen Probenvolumina.

Abhilfe schafft die Verwendung einer diskontinuierlichen PAGE mit Sammelgel und Trenngel (nach LAEMMLI).

Auftrennung der Proteine im Gel

Die Wanderung der Proteine ist abhängig von:

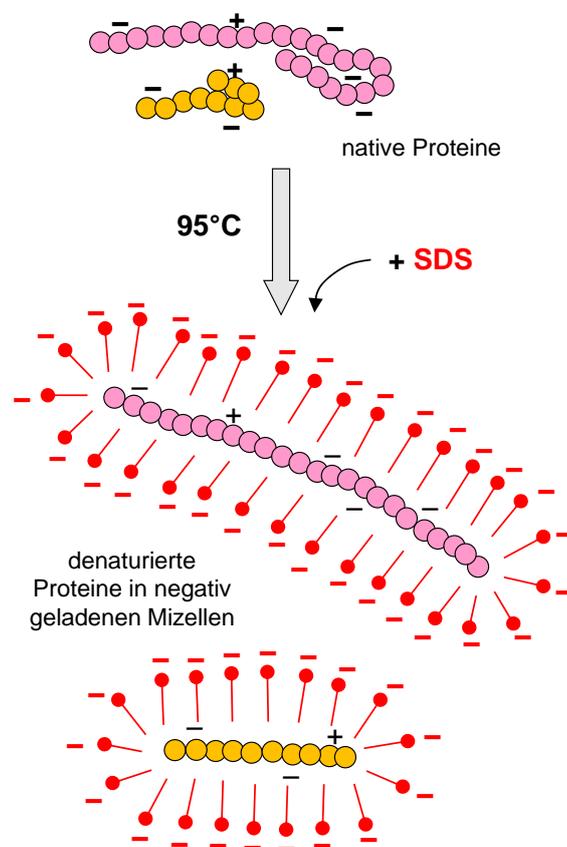
Molekülgröße (Molekulargewicht)

Überstruktur (Faltung)

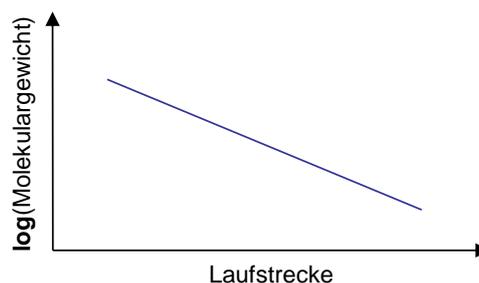
Nettoladung

Damit die Proteine nur nach Größe aufgetrennt werden, müssen die anderen beiden Kriterien ausschaltet werden.

Ladungsmaskierung durch SDS



Zusammenhang zwischen Laufstrecke und Molekulargewicht



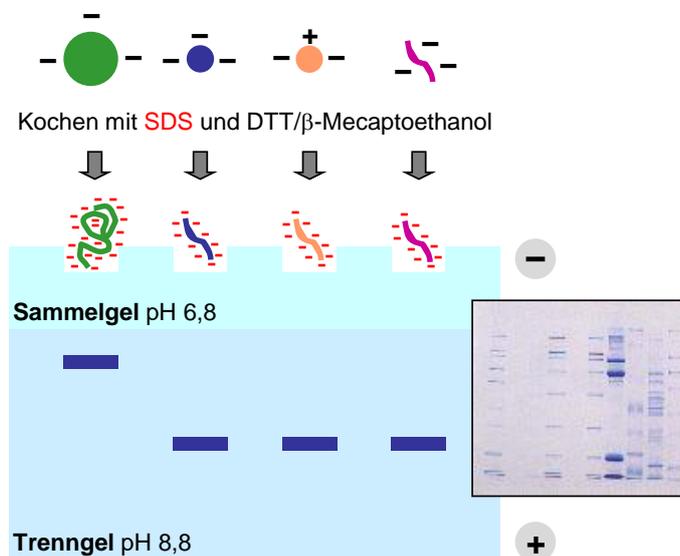
(DISK-)SDS-PAGE nach LAEMMLI

Hierbei handelt es sich um ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, einem **Trenngel** (feinporig, unten) und einem **Sammelgel** (grobporig, oben), die sich beide im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden.

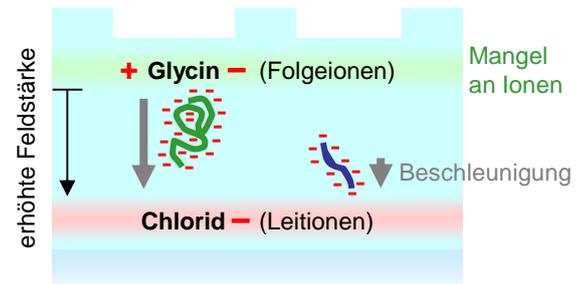
Die Proben werden im Sammelgel zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Dieses führt zu schärferen Banden und erlaubt größere Probenvolumina als in Gelen ohne Sammelgel.

diskontinuierliche, denaturierende PAGE

Auftrennung nach Größe (Molekulargewicht);
scharfe Banden, größere Probenvolumina möglich



Was passiert im Sammelgel?



Beim Anlegen einer Spannung wandern die kleinen Chlorid-Ionen aus dem Gel mit hoher Mobilität zur Anode.

Die aus dem Laufpuffer in das Sammelgel eindringenden großen Glycin-Ionen liegen bei dem neutralen pH-Wert des Sammelgels (pH 6,8) als Zwitterionen vor und haben damit im Vergleich zu den Chlorid-Ionen eine geringe Nettoladung und damit auch eine geringe Mobilität.

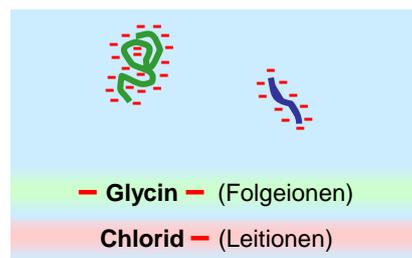
Die schnell wandernden Chlorid-Ionen bilden somit die Leit-Ionen, die sehr langsam wandernden Glycin-Ionen wirken als Folgeionen.

Die Proteine der Probe werden zwischen den schnellen Leit-Ionen und langsamen Folgeionen laufen.

Da sich zwischen dem Leit- und Folgeionen ein Spannungsgradient aufbaut (und damit eine höhere Feldstärke wirksam wird), werden die langsam laufenden Proteine der Probe beschleunigt bis sie kurz hinter den Leit-Ionen in einer eng begrenzten Zone laufen. Die schnell laufenden Proteine werden kurz vor den Leit-Ionen durch deren negative Ladung abgebremst.

→ **Alle Proteine kommen gemeinsam an der Grenze zum Trenngel an und werden dort in einer eng begrenzten Zone konzentriert.**

Was passiert im Trenngel?



Wenn die Ionenfront das Trenngel erreicht hat, wird das Glycin durch den erhöhten pH-Wert des Gels vollständig dissoziiert vorliegen.

Durch die daraus resultierende deutlich erhöhte negative Nettoladung steigt die elektrische Mobilität der Glycin-Ionen drastisch an, sie überholen die Proteine, die damit aus der Konzentrierungszone der erhöhten Feldstärke entlassen werden.

Durch die engen „Maschen“ des Trenngels kommt es jetzt zur **Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht**.