

GPC/SEC mit Dreifachdetektion

Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 19

Proteine - eine sehr spezielle GPC/SEC-Applikation

Problemstellung

Wir betreiben in unserem Labor eine GPC/SEC-Anlage mit Dreifachdetektion in wässrigen Medien. Bislang wurden überwiegend Biopolysaccharide analysiert, zukünftig sollen auch Proteinproben untersucht werden.

Frage

In welchen Punkten unterscheidet sich die Proteinanalytik in der GPC/SEC von der Analytik von Polysacchariden und anderen Biopolymeren?

Lösung

Die Proteinanalytik ist eine eigene, sehr spezielle Applikation im Bereich der GPC/SEC die sich stark von der Analyse von Polymeren und Biopolymeren unterscheidet. Zwar sind Proteine auch natürlich vorkommende Makromoleküle wie z. B. Stärke und Dextrane, aufgrund Ihrer sehr komplexen und meist sehr dichten Sekundär- und Tertiärstruktur unterscheiden sie sich aber maßgeblich von anderen Biopolymeren. Proteinen sind nahezu die einzigen Makromoleküle die praktisch monodispers, also mit identischem Molekulargewicht, vorliegen (Abb. 1). Andere Biopolymere weisen in der Regel immer eine Verteilung von Molekulargewichten auf. Proteine stellen besondere Ansprüche an die Säulenmaterialien. Trennsäulen auf Methacrylatbasis die überwiegend für die Trennung von Biopolymeren verwendet werden sind für Proteine aufgrund starker Wechselwirkungen zwischen Probe und Säulenmaterial nicht geeignet. Es werden entweder Silicasäulen eingesetzt oder Säulen auf Biopolymerbasis (Superdex, Superose). Als Puffer wird meist ein neutraler Phosphatpuffer verwendet. Die Analyse wird überwiegend bei Raumtemperatur durchgeführt, spezielle Proteine müssen bei tieferen Temperaturen, z. B. 4°C, analysiert werden. Oft wird dazu das gesamte GPC/SEC-System in einem Klimaschrank aufgebaut wo es auf die notwendige Analysentemperatur gekühlt wird.

Da Proteine wie bereits erwähnt meist monodispers sind kommt der Kalibrierung des GPC/SEC-Systems mit dualer Detektion (Lichtstreuung und Brechungsindexdetektion) oder Dreifachdetektion (Lichtstreuung, Viskositätsdetektion, Brechungsindexdetektion und ggf. UV-Detektion) eine besondere Bedeutung zu. Während man im Bereich der Biopolymere das System problemlos mit einem eng verteilten Polysaccharid-Standard (z. B. Pullulan-Standard) kalibrieren kann ist es im Proteinbereich von großer Bedeutung dass auch der Kalibrierstandard monodispers ist. Nur dann kann die Software die Peakverbreiterung die durch die Trennsäule verursacht wird und die Peakasymmetrie (Sigma- und Tau-Werte, siehe Tipps & Tricks Nr. 8) wie auch die Offset-Werte (Volumen-Abstand der Detektoren) exakt berechnen. Daher eignet sich z. B. ein monodisperser Proteinstandard zur Kalibration. Nur dann resultiert bei einer monodispersen Proteinprobe für die aus der Lichtstreuung berechnete Molekulargewichtskurve eine horizontale Linie (gleiche Masse an jedem Punkt des Peaks) wie dies in Abbildung 1 dargestellt ist.

Mit der GPC/SEC können dann auch Protein-Aggregationen erkannt und quantifiziert werden (siehe Abb. 2). Vor allem der Lichtstreuendetektor kann aufgrund seiner Molekulargewichts-abhängigkeit auch noch kleine Mengen an hochmolekularen Proteinaggregaten gut erkennen. Der Viskositätsdetektor hingegen kann die molekulare Dichte der Proteine bestimmen und daraus (zusammen mit dem Molekulargewicht) den hydrodynamischen Radius des Proteins berechnen. Diese Größe lässt Rückschlüsse auf die Struktur des Proteins zu.

Schlussfolgerung

Die GPC/SEC mit Dreifach- oder Vierfachdetektion ist ein leistungsfähiges Werkzeug in der Proteinanalytik. Es können nicht nur die absoluten Molekulargewichte der Proteine bestimmt werden sondern es können auch Informationen zu deren Struktur gewonnen werden. Auch

GPC/SEC mit Dreifachdetektion Tipps & Tricks Ausgabe Nr. 19

die Menge an Proteinaggregationen kann bestimmt werden. Allerdings stellt die GPC/SEC mit Lichtstreuung oder Dreifachdetektion gewisse Anforderungen an den Anwender; es müssen für jedes Protein geeignete Methoden entwickelt werden hinsichtlich des Laufmittels, der Trennsäulen, der Temperatur und anderer Parameter. Besondere Sorgfalt gilt der Kalibrierung des Systems; es muss ein geeigneter monodisperser Proteinstandard verwendet werden. Nur dann werden die Molekulargewichte der Proteinproben exakt bestimmt.

Author: Dr. Gerhard Heinzmann, Viscotek GmbH

Für weitere Informationen können Sie jederzeit sehr gerne Kontakt zu uns aufnehmen

Abb.1: Brechungsindexchromatogramm und Molekulargewichtskurve für eine monodisperse Proteinprobe

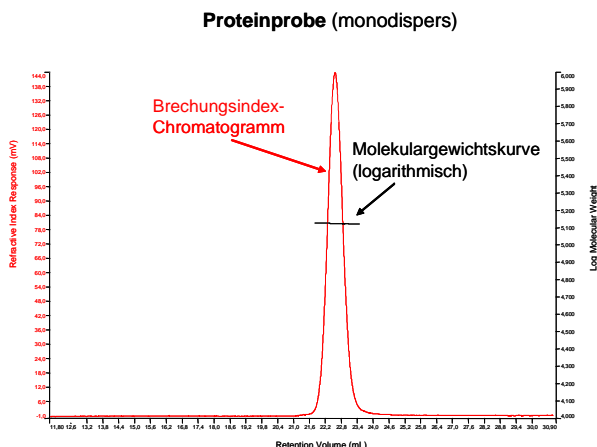
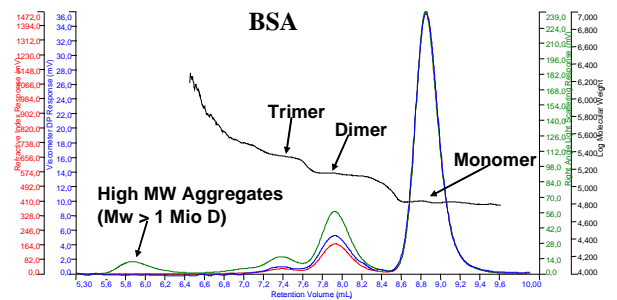


Abb.2: Proteinprobe mit Aggregationen



	Mw (D)	IVw (dl/g)	Rh (nm)	Weight Fraction (%)
Monomer	66.430	0,056	3,88	86,9
Dimer	133.000	0,071	5,32	10,2
Trimer	201.000	0,095	6,69	2,9