

Proteinanalytik mit GPC

Problemstellung

Es soll eine Trennung von abgebauten Proteinen nach Molekülgröße erreicht werden.

Frage

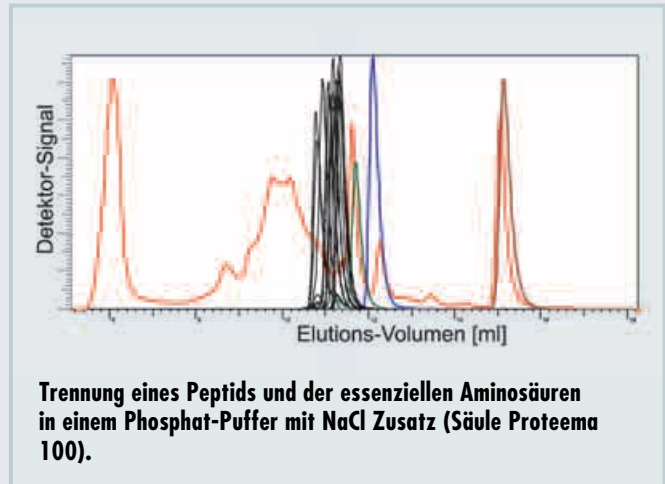
Welche Ergebnisse können erzielt werden, wenn abgebaute Proteine oder Peptide nach Molekülgröße getrennt werden?

Antwort

Proteinhydrolysate oder Peptide können nach Molmasse getrennt werden. Die Elution der freien Aminosäuren muss berücksichtigt werden. Beim enzymatischen Proteinabbau bzw. der Hydrolyse entstehen oft spezifische Bruchstücke und – je nach Abbaugrad – freie Aminosäuren. Die Elutionsbedingungen müssen daher so gewählt werden, dass sowohl die Bruchstücke als auch die freien Aminosäuren möglichst vollständig eluieren. Die Elution der freien Aminosäuren ist zu prüfen. Abhängig vom Säulenmaterial und den chromatographischen Bedingungen können unterschiedliche funktionelle Gruppen bzw. Aminosäuren absorbiert werden.

Eine Polymer-basierende Säule für die Protein-Analytik wird im neutralen oder basischen Puffersystem vorzugsweise die kationischen freien Aminosäuren stärker zurückhalten. Die Elutionszeit muss so angepasst werden, dass alle Probenbestandteile die Säule verlassen haben (bei dieser Säule etwa das sechsfache Säulenvolumen). Eine Silica-basierende Säule retardiert vorzugsweise die Aminosäuren mit Aromaten im Molekül. Auch hier muss die Elutionszeit angepasst werden (bei dieser Säule etwa das zweifache Säulenvolumen). Die Proteinbruchstücke werden nach Molmasse getrennt, und der Abbaugrad von Proteinhydrolysaten kann sicher detektiert werden.

Die Abbildung zeigt die Trennung eines Peptides (rot), die schwarze Kurve ist das Tryptophan, die blaue Kurve das Phenylalanin, die grüne Kurve das Tyrosin. Die schwarzen Kurven sind alle anderen essenziellen Aminosäuren, die ohne Wechselwirkung eluiert werden können. Der Salzgehalt beträgt hier 0,3 M NaCl und hat, wie in der vorherigen Folge beschrieben, einen Einfluss auf die Güte der Trennung.



Trennung eines Peptids und der essenziellen Aminosäuren in einem Phosphat-Puffer mit NaCl Zusatz (Säule Proteema 100).

Fazit

GPC von Proteinen:

- Die chromatographischen Bedingungen für die Trennung der Peptide müssen optimiert werden.
- Die Elution der freien Aminosäuren muss beobachtet werden.
- Unterschiedliche Säulenmaterialien können bei unterschiedlichen, funktionellen Gruppen verschiedene Aminosäuren retardieren.
- Nicht alle Aminosäuren eluieren nach dem reinen GPC-Mechanismus.

Fax: +49 (0 61 31) 9 62 39 - 11

InfoClick

161748

Sie interessieren sich für eine vorherige Ausgabe der GPC Tipps & Tricks? www.laborpraxis.de und InfoClick genügt!

Ausgabe	Thema	InfoClick
LaborPraxis 10/2004	Warum ist das Detektorsignal so klein?	136393
LaborPraxis 11/2004	Wechselwirkungsfreie GPC-Messungen	138181
LaborPraxis 12/2004	Warum ist die GPC eine Relativmethode?	140562
LaborPraxis 1/2 2005	Molmassen mit universeller Kalibration bestimmen	142368
LaborPraxis 3/2005	Wie erkennt man ein Säulenmismatch?	144656
LaborPraxis 5/2005	Wie exakt ist die GPC?	149852
LaborPraxis 7-8/2005	GPC-Kopplungsmethoden – mehr Informationen über die Moleküle?	155365
LaborPraxis 9/2005	Proteinanalytik mit GPC (Salzeffekte und Proteinfragmente)	157940
LaborPraxis 10/2005	Proteinanalytik mit GPC (Proteinfragmente)	160665