

SEMINAR 1:

Inhalt von Praktikum 1

1. DC von Aminosäuren
2. Pipettierübung (Präzisionskontrolle)
3. Gelfiltration
4. Elektrophoretische Trennung von Serumproteinen

Trennmethoden

- Dünnschichtchromatographie
- Ionenaustauschchromatographie
- Reversed Phase Chromatography
(apolare stationäre Phase, polares Elutionsmittel = mobile Phase)
- Gaschromatographie
- Gelfiltration (Größenausschluss Chromatographie)
- Affinitätschromatographie

- Elektrophorese

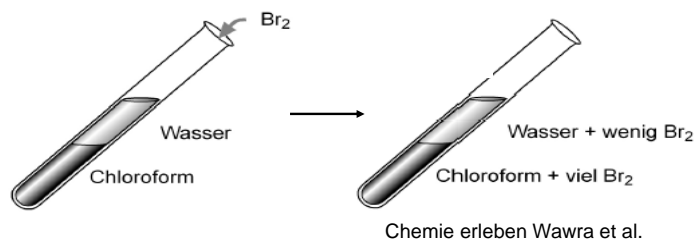
Allen Methoden ist gemeinsam, dass die Moleküle durch den unterschiedlich langen Aufenthalt in zwei nicht mischbaren Phasen getrennt werden.

Phasen sind z.B. Lösungsmittel, Oberflächen, Antikörper, ...

Nernstscher Verteilungssatz

Beschreibt die Verteilung eines Stoffes zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Phasen (z.B. gasförmig / flüssig oder flüssig / fest oder flüssig / flüssig).

$$\text{Verteilungskoeffizient } c = \frac{[\text{Br}_2]_{\text{Wasser}}}{[\text{Br}_2]_{\text{Chloroform}}}$$

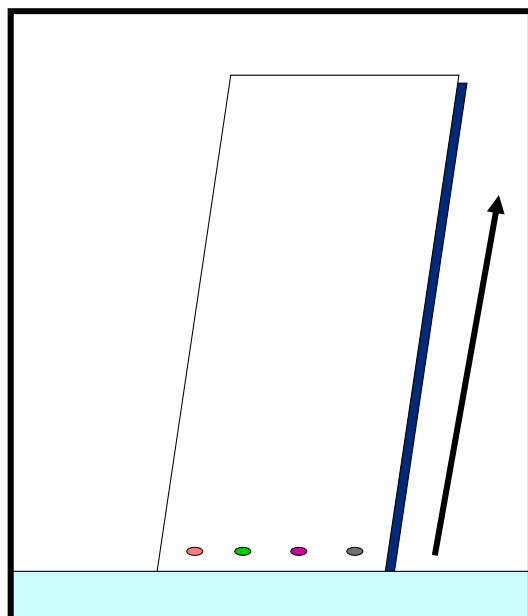
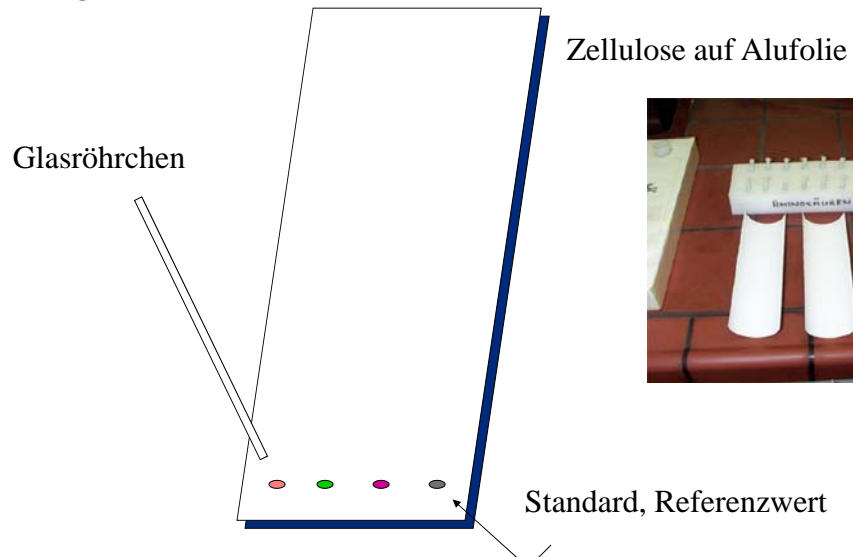


1. Trennung von Aminosäuren mittels der Dünnschichtchromatographie

- Stationäre Phase
 - Zellulose auf Aluminiumträger, (= mit Wasser gefülltes Gel)
 - = **hydrophil**
- Mobile Phase
 - Organisches Lösungsmittel
 - = **hydrophob**

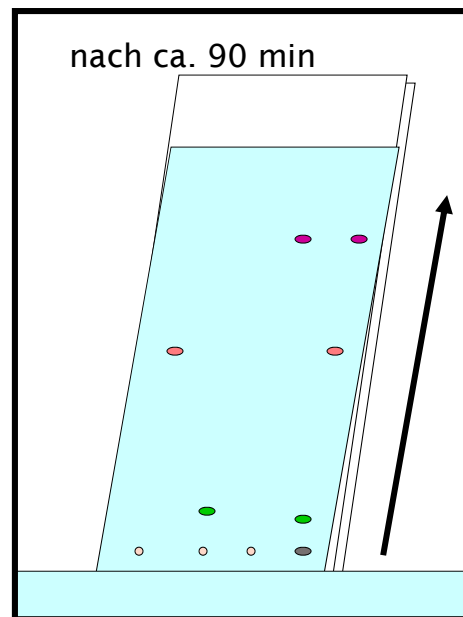


Auftragen der Proben

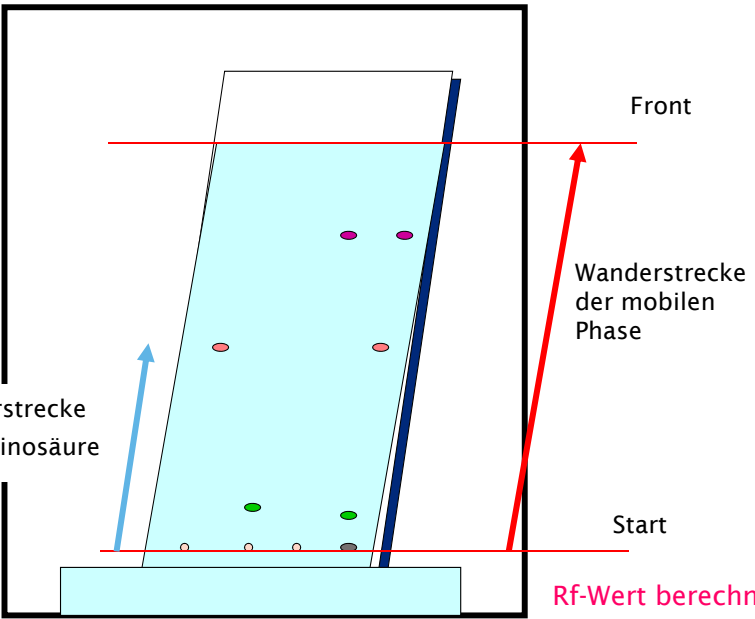


Glastrog

Laufmittel=
mobile Phase



nach ca. 90 min



Front

Wanderstrecke der mobilen Phase

Start

Rf-Wert berechnen

Wanderstrecke der Aminosäure

Markieren der Front & Rf-Wert berechnen

MEDICAL UNIVERSITY OF VIENNA

Seminar 1
Medizinische Chemie

9

Auswertung



Front

Substanz

Auftragstelle

$$\frac{W(as)}{W(m)} = Rf(as) = \text{Retentionsfaktor}$$

$$\frac{[Aminosäure]_{\text{mobile Phase}}}{[Aminosäure]_{\text{stationäre Phase}}} = \text{Verteilungskoeffizient } c$$

Chemie erleben, Wawra et al.

Nernstscher Verteilungssatz Beschreibt die Verteilung eines Stoffes zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Phasen.
(z.B. gasförmig/flüssig oder flüssig/fest oder flüssig/flüssig).

MEDICAL UNIVERSITY OF VIENNA

Seminar 1
Medizinische Chemie

10

2. Pipettierübung (Präzisionskontrolle)

1. In eine Mikrotiterplatte werden in eine Spalte achtmal 125 μl Wasser pipettiert und
2. 75 μl gelbe Farbstofflösung zugesetzt.
3. Nach Pipettieren der Farbstofflösung wird durch mehrfaches Aufziehen mit der Pipette gemischt!
4. Die 1. Spalte dient als Leerwert (LW), in die nur destilliertes Wasser (200 μl) pipettiert wird.
5. Die Konzentration des Farbstoffs in diesen Mischungen wird durch Messung der Extinktion bei 415 nm mit einem Photometer bestimmt.
6. Berücksichtigen Sie bei Ihrer Auswertung den LW, indem sie den Mittelwert des LWs bilden und diesen von Ihren Messwerten abziehen! Aus den so erhaltenen 8 Werten/Spalte errechnen Sie nun jeweils den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten. Das Resultat kann bei einem VK <10 % als zufriedenstellend angesehen werden und sollte idealerweise unter 5% liegen.

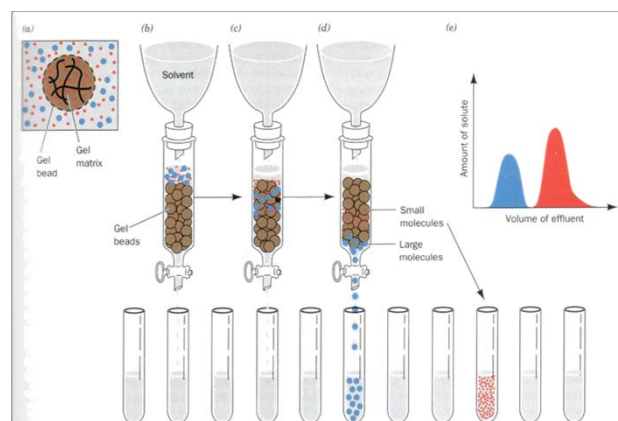


3. Gelfiltration

- Trennung nach Molekülgröße

- Gel als "Molekularsieb"

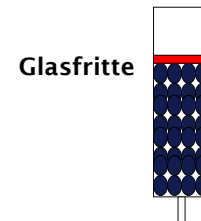
- kleine Moleküle können in Poren der Gelteilchen eindringen:
 - längerer Weg → verzögerte Wanderung
- große Moleküle sind ausgeschlossen:
 - kürzerer Weg → schnelle Wanderung



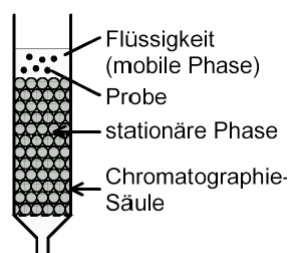
- Matrix: Dextrane, Polyacrylamid

Trennung eines Dextranblau / Methylrot Gemisches mittels Gelfiltration

- Sephadex G25 Säulenmaterial in Elutionspuffer (= mobile Phase) equilibriert.
- 0.5 ml der Probe direkt auf die trockengelauene Glasfritte auftragen.
(Dextranblau und Methylrot)
- Wenn vollkommen ins Säulenmaterial eingedrungen, ca. 5 ml Elutionspuffer nachspülen.
- Austretender Elutionspuffer in Fraktionen zu je 20 Tropfen (= ca. 1 ml) sammeln.
- Um Methylrot sichtbar zu machen, Fraktionen mit 1 Tropfen HCl ansäuern.



3. Gelfiltration

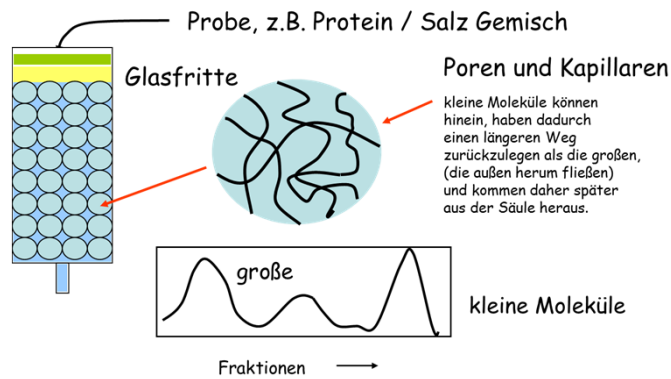


Säulenchromatographie

Chemie erleben, Wawra et al.



Schema der Trennung eines Dextranblau / Methylrot Gemisches mittels Gelfiltration



Dextranblau: großes Molekül, eluiert zuerst
Methylrot: kleines Molekül, kommt später aus der Säule heraus

Ionenaustausch- bzw. Affinitätschromatographie

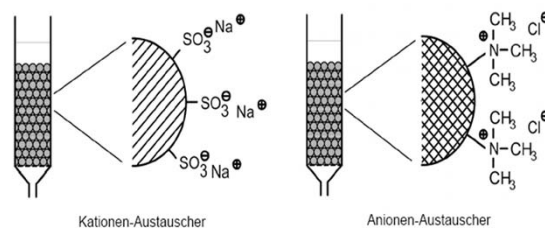
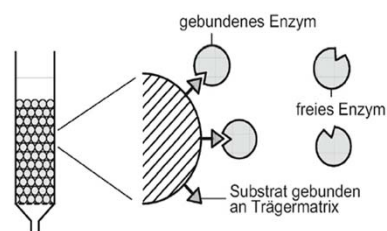


Abb. aus "Chemie erleben", Wawra, Dotzign und Müller, Facultas / UTB Verlag, 2003



Ionenaustauscher:

z.B. Austausch der Na^+ -Ionen gegen Ca^{++} -Ionen, anschließend Elution von Ca^{++} mit Lösung mit hoher Na^+ -Konzentration

Affinitätschromatographie:

z.B. Reinigung eines Enzyms aus einer komplexen Mischung von Proteinen

4. Elektrophorese

Die Trennung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld.



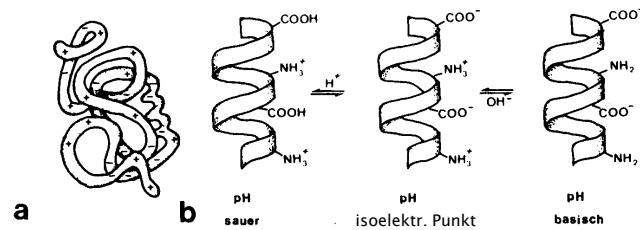
Trennung und quantitative Analyse der Serumproteine

Voraussetzungen:

- Serumproteine müssen positiv oder **negativ** geladen sein.
- richtige Wahl des Puffers !
- Trägermaterial (analog zur stationären Phase)
- Gleichstromquelle

Welchen pH-Wert muss die Pufferlösung haben, wenn die Proteine zur Anode wandern sollen?

- pI (Serumproteine) ~ 5
- Anode = + Pol
- Kathode = - Pol
- Puffer soll $\text{pH} > 5$ sein, also in der Praxis bei 9 liegen



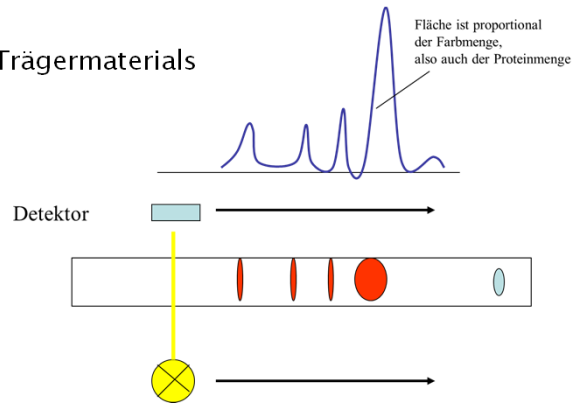
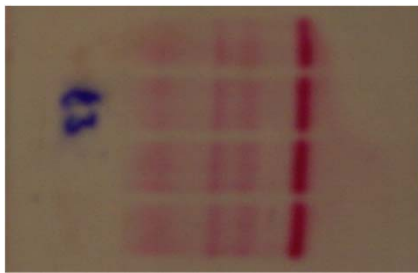
Elektrophorese - Durchführung

Vorbereitung - Pipettieren kleiner Volumina - Proben auftragen

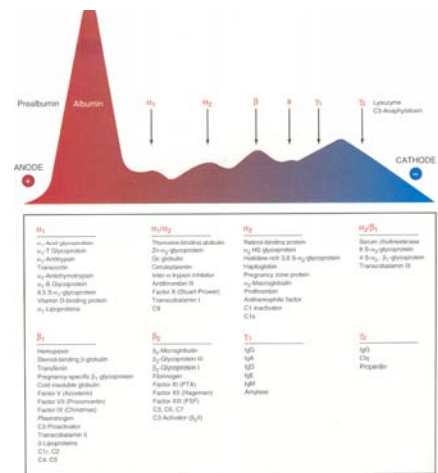
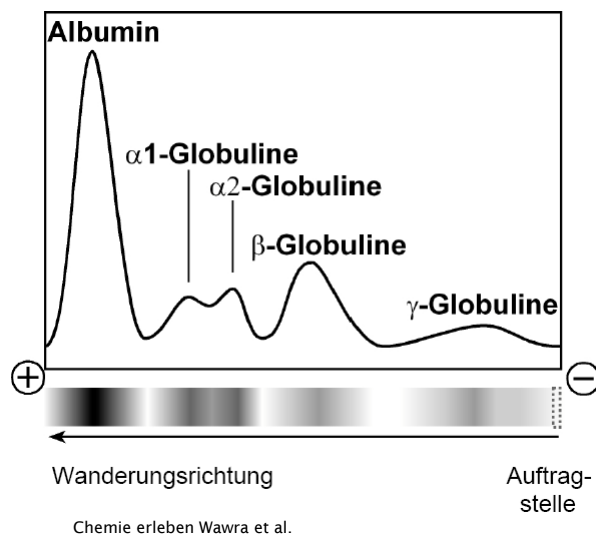


Nach der Elektrophorese

- Färben der Proteine
- Trägermaterial durchsichtig machen
- Densitometrische Auswertung
- Messen der Farbstoffdichte entlang des Trägermaterials



Elektropherogramm



Diagnostische Aussagemöglichkeiten:

