

Reiner Westermeier

# Elektrophorese leicht gemacht

Ein Praxisbuch für Anwender

2. Auflage





*Reiner Westermeier*

**Elektrophorese leicht  
gemacht**



*Reiner Westermeier*

# **Elektrophorese leicht gemacht**

Ein Praxisbuch für Anwender

2. Auflage

**WILEY-VCH**  
Verlag GmbH & Co. KGaA

**Autor**

**Reiner Westermeier**  
Auenstr. 4a  
85354 Freising  
Deutschland

**2. Auflage 2016**

Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

**Bibliografische Information der  
Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,  
Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

**Umschlaggestaltung** Grafik-Design Schulz,  
Fußgönheim

**Satz** le-tex publishing services GmbH, Leipzig

**Print ISBN** 978-3-527-33892-4

**ePDF ISBN** 978-3-527-69513-3

**ePub ISBN** 978-3-527-69514-0

**Mobi ISBN** 978-3-527-69515-7

Gedruckt auf säurefreiem Papier.

## Inhaltsverzeichnis

**Geleitwort** *XV*

**Vorwort** *XVII*

**Vorwort zur ersten Auflage** *XIX*

**Abkürzungen** *XXI*

### **Teil I Grundlagen** *1*

- 1**     **Elektrophorese** *7*
  - 1.1     Allgemeines *7*
    - 1.1.1   Elektrophoresen in freier Lösung *7*
    - 1.1.2   Elektrophoresen in stabilisierenden Medien *11*
    - 1.1.3   Gelelektrophorese *12*
    - 1.1.4   Stromversorger *20*
    - 1.1.5   Trennkammern *20*
  - 1.2     Elektrophoresen in nicht restriktiven Gelen *25*
    - 1.2.1   Agarosegelelektrophorese *25*
    - 1.2.2   Polyacrylamidgelelektrophorese von niedermolekularen Substanzen *27*
  - 1.3     Elektrophorese in restriktiven Gelen *28*
    - 1.3.1   Der Ferguson-Plot *28*
    - 1.3.2   Agarosegelelektrophorese *29*
    - 1.3.3   Polyacrylamidgelelektrophorese von Nukleinsäuren *31*
    - 1.3.4   Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen *34*
  - Literatur *48*
  
- 2**     **Isotachophorese** *53*
  - 2.1     Wanderung mit gleicher Geschwindigkeit *55*
  - 2.2     Trennung der Substanzen in der Form einer Kette *ion train* *55*
  - 2.3     Zonenschärfungseffekt *55*

- 2.4 Konzentrationsregulierungseffekt 56  
Literatur 57
  
- 3 Isoelektrische Fokussierung 59**
  - 3.1 Prinzip 59
  - 3.2 Gele für die IEF 61
    - 3.2.1 Polyacrylamidgele 61
    - 3.2.2 Agarosegele 63
  - 3.3 Temperatur 64
  - 3.4 Kontrolle des pH-Gradienten 64
  - 3.5 Arten von pH-Gradienten 65
    - 3.5.1 Freie Trägerampholyten 65
    - 3.5.2 Immobilisierte pH-Gradienten 69
  - 3.6 Präparative Isoelektrische Fokussierung 72
  - 3.7 Titrationskurvenanalyse 73  
Literatur 75
  
- 4 Hochauflösende Zweidimensional-Elektrophorese 79**
  - 4.1 IEF in IPG-Streifen 79
    - 4.1.1 Streifengeometrie 80
    - 4.1.2 pH-Gradienten 80
    - 4.1.3 Einfluss von Salzen 80
    - 4.1.4 Basische pH-Gradienten 81
    - 4.1.5 Rehydratisieren von IPG-Streifen 82
    - 4.1.6 Probenaufgabe 85
    - 4.1.7 IEF-Bedingungen 87
    - 4.1.8 Instrumentierung 88
  - 4.2 SDS-PAGE 90
    - 4.2.1 Äquilibrieren der IPG-Streifen 90
    - 4.2.2 Technische Konzepte für die zweite Dimension (SDS-PAGE) 91
    - 4.2.3 Geltypen 93
    - 4.2.4 Gelherstellung 94
    - 4.2.5 Durchführung der SDS-Elektrophorese 97
  - 4.3 Proteomik 99  
Literatur 99
  
- 5 Proteinprobenvorbereitung 103**
  - 5.1 Proteinquantifizierungsmethoden 103
  - 5.2 Vorbereitung von nativen Proben 104
  - 5.3 Proben für die SDS-Elektrophorese 105
    - 5.3.1 SDS-Behandlung 105
    - 5.3.2 Aufreinigung und Proteinanreicherung 109
  - 5.4 Proben für die hochauflösende 2-D-PAGE 110
    - 5.4.1 Waschen von Zellen 111
    - 5.4.2 Zellaufschluss 111

- 5.4.3 Probennahme und -aufbewahrung 112
- 5.4.4 Inaktivierung von Proteasen 114
- 5.4.5 Inaktivierung von Phosphatasen 114
- 5.4.6 Alkalische Bedingungen 114
- 5.4.7 Entfernung von störenden Substanzen 115
- 5.4.8 Vorfraktionierung 116
- 5.4.9 Spezialfall: Pflanzenproteine 117
- Literatur 118
  
- 6 Proteindetektion 121**
- 6.1 Fixierung 121
- 6.1.1 IEF-Gele 121
- 6.1.2 Agarosegele 122
- 6.1.3 SDS-Polyacrylamidgele 122
- 6.2 Färbungen nach der Elektrophorese 122
- 6.2.1 Organische Farbstoffe 122
- 6.2.2 Silberfärbung 123
- 6.2.3 Negativfärbung 125
- 6.2.4 Fluoreszenzfärbung 126
- 6.2.5 Spezifische Detektion 127
- 6.2.6 Visualisierung ohne Färbung 128
- 6.3 Proteinmarkierung 129
- 6.3.1 Proteinmarkierung mit Fluorophoren 129
- 6.3.2 Radioaktive Markierung von lebenden Zellen 130
- 6.4 Differenzgelelektrophorese (DIGE) 130
- 6.4.1 Minimal-Lysinmarkierung 131
- 6.4.2 Sättigung-Cysteinmarkierung 133
- 6.4.3 Der interne Standard 134
- 6.4.4 Planung eines Experiments 134
- 6.4.5 Die wichtigsten Vorteile von 2-D-DIGE 134
- 6.4.6 Vergleichende Fluoreszenzgelelektrophorese 135
- 6.5 Bildaufzeichnung, Bildanalyse, Spotpicken 136
- 6.5.1 Gehaltsbestimmungen 136
- 6.5.2 Bildaufzeichnungssysteme 138
- 6.5.3 Bildanalyse 141
- 6.5.4 Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen 144
- Literatur 146
  
- 7 Blotting 151**
- 7.1 Transfermethoden 151
- 7.1.1 Diffusions-Blotting 151
- 7.1.2 Kapillar-Blotting 152
- 7.1.3 Press-Blotting 153
- 7.1.4 Vakuum-Blotting 153
- 7.1.5 Elektrophoretisches Blotting 154

7.2	Blotmembranen	157
7.3	Puffer für elektrophoretische Transfers	158
7.3.1	Proteine	158
7.3.2	Nukleinsäuren	160
7.4	Allgemeine Anfärbung	160
7.5	Blockieren	161
7.6	Spezialdetektion	161
7.6.1	Hybridisierung	161
7.6.2	Enzym-Blotting	162
7.6.3	Immun-Blotting	162
7.6.4	Lektin-Blotting	165
7.6.5	Stripping, Mehrfachanalyse	166
7.6.6	Doppel-Blotting	166
7.7	Proteinsequenzierung	166
7.8	Transferprobleme	166
7.9	Elektroelution von Proteinen aus Gelen	167
	Literatur	169

## **Teil II Praktische Methodenanleitungen – Ausrüstung und Methoden** 173

### **Methode 1 PAGE von Farbstoffen** 183

M1.1	Probenvorbereitung	183
M1.2	Stammlösungen	183
M1.3	Vorbereitung der Gießkassette	184
M1.3.1	Dichtung	184
M1.3.2	Slotformer	184
M1.3.3	Zusammenbau der Gießkassette	185
M1.4	Gießen der ultradünnen Gele	187
M1.5	Elektrophoretische Trennung	187
M1.5.1	Entnahme des Gels aus der Kassette	187

### **Methode 2 Agarose- und Immunelektrophoresen** 191

M2.1	Probenvorbereitung	191
M2.2	Stammlösungen	192
M2.3	Herstellung der Gele	192
M2.3.1	Agarosegelelektrophorese	192
M2.3.2	Immunelektrophoresegele	194
M2.4	Elektrophoresen	198
M2.4.1	Grabar-Williams-Technik	199
M2.4.2	Laurell-Technik	199
M2.5	Proteinnachweis	200
M2.5.1	Coomassie-Färbung (Agaroseelektrophorese)	200
M2.5.2	Immunfixation der Agaroseelektrophorese	200

- M2.5.3 Coomassie-Färbung (Immunelektrophoresen) 201
- M2.5.4 Silberfärbung 202
  - Literatur 202

### **Methode 3 Titrationskurvenanalyse 203**

- M3.1 Probenvorbereitung 203
- M3.2 Stammlösungen 203
- M3.3 Herstellung der leeren Gele 204
  - M3.3.1 Vorbereitung der Gießform 204
  - M3.3.2 Zusammenbau der Gelkassette 205
  - M3.3.3 Befüllen der Gelgießkassette 207
  - M3.3.4 Entnahme des Gels aus der Gießkassette 207
- M3.4 Titrationskurvenelektrophorese 209
  - M3.4.1 Erzeugung des pH-Gradienten (Lauf ohne Probe) 209
  - M3.4.2 Nativelektrophorese im pH-Spektrum 210
- M3.5 Coomassie- und Silberfärbung 210
  - M3.5.1 Kolloidale Coomassie-Färbung 210
  - M3.5.2 Acid-Violet-17-Färbung 211
  - M3.5.3 Fünf-Minuten-Silberfärbung getrockneter Gele 211
- M3.6 Interpretation der Kurven 212
  - Literatur 214

### **Methode 4 Native PAGE in amphoteren Puffern 215**

- M4.1 Probenvorbereitung 216
- M4.2 Stammlösungen 217
- M4.3 Herstellung der leeren Gele 218
  - M4.3.1 Slotformer 218
  - M4.3.2 Zusammenbau der Gießkassette 219
  - M4.3.3 Polymerisationslösungen 220
  - M4.3.4 Befüllen der gekühlten Gelgießkassette 221
  - M4.3.5 Entnahme des Gels aus der Gießkassette 221
  - M4.3.6 Waschen und Trocknen der Gele 222
  - M4.3.7 Quellen des Gels im amphoteren Puffer 222
- M4.4 Elektrophorese 224
- M4.5 Coomassie- und Silberfärbung 226
  - M4.5.1 Kolloidale Coomassie-Färbung 226
  - M4.5.2 Acid-Violet-17-Färbung 227
  - M4.5.3 Fünf-Minuten Silberfärbung getrockneter Gele 227
- Literatur 228

### **Methode 5 Agarosegel-IEF 231**

- M5.1 Probenvorbereitung 231
- M5.2 Herstellung des Agarosegels 232
  - M5.2.1 Hydrophobisierung des Abstandhalters 232
  - M5.2.2 Zusammenbau der Gelkassette 232

M5.2.3	Herstellung der Agaroselösung (0,8 % Agarose)	233
M5.3	Isoelektrische Fokussierung	235
M5.3.1	Herstellung der Elektrodenlösungen	235
M5.4	Proteinnachweis	237
M5.4.1	Coomassie-Blau-Färbung	237
M5.4.2	Immunfixation	237
M5.4.3	Silberfärbung	238
	Literatur	239

**Methode 6 PAGIEF in rehydratisierten Gelen** 241

M6.1	Probenvorbereitung	241
M6.2	Stammlösungen	241
M6.3	Herstellung der leeren Gele	242
M6.3.1	Hydrophobisierung des Abstandhalters	242
M6.3.2	Zusammenbau der Gelkassette	242
M6.3.3	Befüllen der Gelgießkassette	243
M6.3.4	Entnahme des Gels aus der Gießkassette	244
M6.3.5	Waschen des Gels	244
M6.3.6	Trocknen des Gels	245
M6.4	Isoelektrische Fokussierung	245
M6.4.1	Rehydratisierlösung (Servalyt™, Pharmalyte™)	245
M6.4.2	Quellen des Gels	245
M6.4.3	Proteintrennung	246
M6.4.4	Probenaufgabe	247
M6.5	Coomassie- und Silberfärbung	248
M6.5.1	Kolloidale Coomassie-Färbung	248
M6.5.2	Acid-Violet-17-Färbung	249
M6.5.3	Die empfindlichste Silberfärbung für die IEF	249
M6.6	Methodischer Ausblick	251
	Literatur	253

**Methode 7 Horizontale SDS-Polyacrylamidelektrophorese** 255

M7.1	Probenvorbereitung	255
M7.1.1	Nicht reduzierende SDS-Behandlung	255
M7.1.2	Reduzierende SDS-Behandlung	256
M7.1.3	Reduzierende SDS-Behandlung mit Alkylierung	257
M7.2	Proteinmarkierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff	257
M7.2.1	Markierung	257
M7.2.2	Detektion	258
M7.3	Stammlösungen für die Gelherstellung	258
M7.4	Vorbereitung der Gießkassette	259
M7.4.1	Herstellen des Slotformers	259
M7.4.2	Zusammenbau der Gießkassette	260
M7.5	Gradienten-Gel	261
M7.5.1	Gießen des Gradientengels	261

M7.6	Elektrophorese	265
M7.6.1	Vorbereitung der Trennkammer	265
M7.6.2	Entnahme des Gels aus der Kassette	265
M7.6.3	Platzierung auf der Kühlplatte	265
M7.6.4	Elektrophorese	267
M7.7	Coomassie- und Silberfärbung	267
M7.7.1	Heiße Coomassie-Färbung	267
M7.7.2	Kolloidalfärbung	268
M7.7.3	Reversible Imidazol-Zink-Negativfärbung	269
M7.7.4	Silberfärbung	270
M7.7.5	Fluoreszenzfärbung mit SERVA Purple	270
M7.8	Blotting	271
M7.9	Methodischer Ausblick	272
M7.9.1	SDS-Elektrophorese in gewaschenen und rehydratisierten Gelen	272
M7.9.2	Trennung von Peptiden	273
	Literatur	274

#### **Methode 8 Vertikale PAGE** 275

M8.1	Probenvorbereitung und Proteinmarkierung	276
M8.2	Stammlösungen für die SDS-PAGE	277
M8.3	Gießen von Einzelgelen	278
M8.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele	278
M8.3.2	Gradientengele	279
M8.4	Gießen von Mehrfachgelen	281
M8.4.1	Multiple diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele	282
M8.4.2	Multiple SDS-Polyacrylamidgradientengele	283
M8.5	Elektrophorese	286
M8.6	SDS-Elektrophorese von niedermolekularen Peptiden	288
M8.6.1	Stammlösungen	288
M8.7	Zweidimensional-Elektrophorese	289
M8.8	DNA-Elektrophorese	290
M8.9	Langzeitstabile Gele	291
M8.10	Proteindetektion	291
M8.11	Präparieren von Glasplatten mit Bind-Silan	292
M8.11.1	Beschichten einer Glasplatte mit Bind-Silan	292
M8.11.2	Entfernen von Gel und Bind-Silan von einer Glasplatte	293
	Literatur	293

#### **Methode 9 Blau-Nativ-PAGE** 295

M9.1	Solubilisierung	295
M9.2	Stammlösungen	296
M9.3	Gießen der Gele	297
M9.4	Elektrophorese	299
	Literatur	300

**Methode 10 Semidry-Blotting von Proteinen 301**

- M10.1 Transferpuffer 303
  - M10.1.1 Kontinuierliches Puffersystem 303
  - M10.1.2 Diskontinuierliches Puffersystem 303
  - M10.1.3 Transfers aus Agarosegelen 304
- M10.2 Technische Durchführung 304
  - M10.2.1 Gele ohne Trägerfolie 305
  - M10.2.2 Trägerfoliengebundene Gele 306
  - M10.2.3 Bei Verwendung von Nitrocellulose (NC)-Membran 306
  - M10.2.4 Bei Verwendung einer PVDF-Membran 307
  - M10.2.5 Proteintransfer aus den abgeschnittenen Gelen 308
- M10.3 Färbung von Blotfolien 309
  - M10.3.1 Amidoschwarzfärbung 309
  - M10.3.2 Reversible Färbung 309
  - M10.3.3 Indian-Ink-Färbung 310
- Literatur 311

**Methode 11 IEF im immobilisierten pH-Gradienten 313**

- M11.1 Probenvorbereitung 314
- M11.2 Stammlösungen 314
- M11.3 Immobilinerezepturen 315
  - M11.3.1 Maßgeschneiderte pH-Gradienten 315
- M11.4 Vorbereitung der Gießkassette 318
  - M11.4.1 Hydrophobisierung des Abstandhalters 318
  - M11.4.2 Zusammenbau der Gießkassette 319
- M11.5 Herstellung der pH-Gradientengele 320
  - M11.5.1 Gießen des Gradienten 321
- M11.6 Isoelektrische Fokussierung 327
  - M11.6.1 Probenaufgabe 327
  - M11.6.2 Elektrodenlösungen 328
  - M11.6.3 Fokussierungsbedingungen 328
  - M11.6.4 Messung des pH-Gradienten 329
- M11.7 Coomassie- und Silberfärbung 329
  - M11.7.1 Kolloidale Coomassie-Färbung 329
  - M11.7.2 Acid-Violet-17-Färbung 330
- M11.8 Strategien der IPG-Fokussierung 331
  - Literatur 332

**Methode 12 Hochauflösende Zweidimensional-Elektrophorese 333**

- M12.1 Probenvorbereitung 334
  - M12.1.1 Probenaufreinigung 335
  - M12.1.2 Wichtige Hinweise zur kompletten Resolubilisierung der Pellets 335
- M12.2 Proteinmarkierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff 338
  - M12.2.1 Markierung einer Probe 338
  - M12.2.2 Detektion 338

- M12.3 Stammlösungen für die Gelherstellung 339
- M12.4 Gelherstellung 340
  - M12.4.1 IPG-Streifen 340
- M12.5 SDS-Porengradientengele 344
- M12.6 Trennbedingungen 346
  - M12.6.1 Erste Dimension (IPG-IEF) 346
  - M12.6.2 Äquilibrieren 351
  - M12.6.3 Zweite Dimension (SDS-Elektrophorese) 352
- M12.7 Proteindetektion 356
  - M12.7.1 Färben von multiplen Gelen 356
  - M12.7.2 Kolloidalfärbung 358
  - M12.7.3 Reversible Imidazol-Zink-Negativfärbung 358
  - M12.7.4 Silberfärbung 359
  - M12.7.5 Fluoreszenzfärbung mit SERVA Purple 360
- Literatur 361

### **Methode 13 Zweidimensional-Differenzgelelektrophorese (DIGE) 365**

- M13.1 Planung eines Experiments 365
- M13.2 Probenvorbereitung 366
  - M13.2.1 Solubilisierung von DIGE-Proben 366
  - M13.2.2 Rekonstituierung der CyDyes 367
  - M13.2.3 Für Minimalmarkierung der Lysine 367
  - M13.2.4 Für Sättigungsmarkierung der Cysteine 368
- M13.3 DIGE-Markierung 368
  - M13.3.1 Minimalmarkierung der Lysine 368
  - M13.3.2 Sättigungsmarkierung der Cysteine 369
- M13.4 Vorbereitung für die Probenaufgabe auf die IPG-Streifen 371
- M13.5 Detektion der DIGE-Spots 371
- Literatur 372

### **Methode 14 PAGE von DNA-Fragmenten 373**

- M14.1 Stammlösungen 374
  - M14.1.1 Puffersystem I (Tris-Acetat/Tris-Tricin) 374
  - M14.1.2 Puffersystem II (Tris-Phosphat/TBE) 375
- M14.2 Herstellung der Gele 375
  - M14.2.1 Vorbereitung der Gießkassette 375
  - M14.2.2 Herstellen des Slotformers 376
  - M14.2.3 Zusammenbau der Gießkassette 377
  - M14.2.4 Befüllen der Gelgießkassetten 378
  - M14.2.5 Entnahme des Gels aus der Gießkassette 379
  - M14.2.6 Waschen und Trocknen der Gele 379
- M14.3 Probenvorbereitung 379
  - M14.3.1 PCR-Produkte generell 379
  - M14.3.2 SSCP-Proben 380
- M14.4 Elektrophorese 381

M14.4.1	Anquellen von gewaschenen und getrockneten Gelen	381
M14.4.2	Vorbereitung der Elektrodendochte	383
M14.4.3	Entnahme des Gels aus der Kassette	383
M14.4.4	Platzierung auf der Kühlplatte	384
M14.4.5	Probenaufgabe und Elektrophorese	385
M14.5	Silberfärbung	386

**Anhang A Problemlösungen** 389

A.1	Häufige Fehler	389
A.2	Isoelektrische Fokussierung	392
A.2.1	PAGIEF mit Trägerampholyten	392
A.2.2	Agarosegel-IEF mit Trägerampholyten	401
A.2.3	Immobilisierte pH-Gradienten	406
A.3	SDS-Elektrophorese	413
A.3.1	Horizontale SDS PAGE	413
A.3.2	Vertikale PAGE	422
A.4	Zweidimensional-Elektrophorese	425
A.5	Semidry-Blotting	433
A.6	PAGE von DNA-Fragmenten	440
	Literatur	443

**Stichwortverzeichnis** 445

## Geleitwort

Die Anzahl der elektrophoretischen Trennmethode hat seit Tiselius' grundlegenden Arbeiten, die mit einem Nobelpreis ausgezeichnet wurden, drastisch zugenommen. Der Weg von der Papier-, Celluloseacetat- und Stärkegelelektrophorese über die Molekularsieb-, Disk-, SDS- und Immunelektrophorese bis hin zur Isoelektrischen Fokussierung einschließlich der hochauflösenden zweidimensionalen Elektrophorese hat zusammen mit der Silber- und Goldfärbung, der Autoradiografie, Fluorografie und den Blottingverfahren zu immer höherer Auflösung, Nachweisempfindlichkeit und Spezifität in der Proteinanalytik geführt. Des Weiteren hat sich die Gelelektrophorese als einzigartiges Werkzeug für die DNA-Sequenzierung erwiesen, während die hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese den faszinierenden Weg vom isolierten Protein über die Aminosäuresequenzanalyse zum Gen und nach dessen Klonierung zur Proteinsynthese geebnet hat.

Das Spektrum des Analysenmöglichkeiten ist somit immer vielfältiger geworden, sodass eine zusammenfassende Darstellung der elektrophoretischen Trennmethode nicht nur für den Anfänger, sondern auch für den erfahrenen Praktiker wünschenswert erscheint. Mit dieser Zielsetzung ist dieses Buch geschrieben worden.

Der Autor gehört zum Kreis der *Bluefingers* und hat dies 1979 in Mailand hautnah erfahren müssen, als er nach getaner Laborarbeit in einem Zigarettenkiosk aufgrund der Coomassie-gefärbten Hände in den Verdacht des Geldfälschens geriet, und Prof. P.G. Righetti und ich ihn aus einer bedrohlichen Situation befreien mussten. Somit ist bei diesem Buch gemäß Maurers Definition (Proceedings of the first small conference of the bluefingers, Tübingen 1972) ein Experte am Werk gewesen, der den Weißfingern, die die Methoden nur vom Hörensagen kennen, erzählen kann, wie sie z. B. keine blauen Finger bekommen.

Wie dem auch sei, ich bin sicher, dass die zusammenfassende Darstellung der Methoden nicht nur die Weißfinger, sondern auch die Gemeinschaft der Bluefingers, Silverfingers, Goldfingers usw. erfreuen und mit vielen technischen Details bereichern wird.

Weihenstephan, im Februar 1990

*Priv.-Doz. Dr. Angelika Görg*



## Vorwort

25 Jahre nach dem Erscheinen des „Elektrophorese-Praktikums“ und nach vier Auflagen der englischen Version „Electrophoresis in Practice“ gibt es wieder eine deutschsprachige Version mit dem neuen Namen „Elektrophorese leicht gemacht“. Der Titel deutet an, dass auch dieser Band keine tiefgründige theoretische Ableitungen und Erklärungen der Methoden und Phänomene enthält. Der erste Teil soll einen Überblick über die diversen Techniken nach neuestem Stand vermitteln und konzentriert sich auf Hinweise zur praktischen Durchführung von Elektrophoreseexperimenten. Im zweiten Teil findet man praktische Anleitungen zu 14 Methoden und Problemlösungen, die aufgrund der Erfahrungen im täglichen Geschäft eines „Produktspezialisten für Elektrophorese“ bei verschiedenen Technologieanbietern nochmals deutlich erweitert wurden.

Freising, im Juli 2016

*R. Westermeier*



## Vorwort zur ersten Auflage

Dieses Buch ist für die Praktiker im Elektrophoreselabor verfasst worden. Auf physikochemische Ableitungen und Formeln elektrophoretischer Phänomene wurde deshalb verzichtet.

Die Art und Weise der Erklärungen und die Darstellungsform hat sich aus der jahrelangen Erfahrung bei Anwenderseminaren und -kursen, Abfassung von Bedienungsanleitungen und Lösungen von Anwendungsproblemen ergeben. Sie sollten für technische Assistenten ebenso verständlich sein wie für in der Forschung stehende Wissenschaftler.

In Teil I wird so knapp wie möglich – eine Übersicht über den Stand der Technik in der Elektrophorese – gegeben. Die Literaturzitate erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Der Teil II enthält exakte Arbeitsanleitungen für 12 ausgewählte Elektrophoresemethoden, die mit einer apparativen Ausrüstung durchgeführt werden können. Die Reihenfolge der Methoden wurde in der Weise festgelegt, dass man danach einen Elektrophoresekurs für Anfänger und Fortgeschrittene zusammenstellen kann. Mit diesen Methoden ist der Hauptteil der für das biologische, biochemische, medizinische und lebensmittelchemische Labor notwendigen Techniken abgedeckt.

Sollten – trotz exakten Nacharbeitens der Methodenbeschreibungen – unerklärliche Effekte auftreten, kann man deren Gründe und die zu ihrer Vermeidung notwendigen Maßnahmen im Anhang unter der Rubrik „Problemlösungen“ finden.

Für zusätzliche Hinweise und Problemlösungen aus der Leserschaft ist der Autor dankbar.

Freiburg, im März 1990

*R. Westermeier*



## Abkürzungen

A	Ampere
A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
ACES	<i>N</i> -(2-Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure
AEBSF	Aminoethylbenzylsulfonylfluorid
APS	Ammoniumpersulfat
AU	Absorptionseinheiten (units)
16-BAC	Benzyltrimethyl- <i>n</i> -hexadecylammoniumchlorid
BAC	Bisacryloylcystamin
Bis	<i>N, N'</i> -Methylenbisacrylamid
BNE	Blau-Nativ-Elektrophorese
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Vernetzungsgrad (Crosslinking) (%)
CAPS	3-(Cyclohexylamino)propansulfonsäure
CCD	charge-coupled device
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propansulfat
CM	Carboxymethyl
CoFGE	Komparative (vergleichende) Fluoreszenzgelelektrophorese
const.	konstant
CTAB	Cetyl-trimethylammoniumbromid
Da	Dalton
DBM	Diazobenzoyloxymethyl
DEA	Diethanolamin
DEAE	Diethylaminoethyl
DIGE	Differenzgelelektrophorese
Disk	diskontinuierlich
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPT	Diazophenylthioether
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTE	Dithioerythritol

DTT	Dithiothreitol
<i>E</i>	Feldstärke, angegeben in V/cm
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EEO	Elektroendosmose
EPO	Erythropoietin
ESI	Elektrospray-Ionisation
g/v	Gewicht pro Volumen (Massenkonzentration)
GC	gruppenspezifische Komponente
GLP	Gute Laborpraxis
GMP	Gute Herstellungs (Manufacturing)-Praxis
h	Stunden
HED	Hydroxyethyldisulfid
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HMW	high molecular weight
HPCE	High Performance Capillary Electrophoresis
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<i>I</i>	Stromstärke, angegeben in A, mA
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
ITP	Isotachophorese
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
$K_R$	Retardationskoeffizient
LED	light-emitting diode
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
LMW	low molecular weight
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-assistierte Laserdesorptionsionisierung
MCE	Mikrochipelektrophorese
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatografie
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
mol/L	Einheit der Molarität
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
$m_r$	relative elektrophoretische Mobilität
MS	Massenspektrometrie
Ms <sup><i>n</i></sup>	Massenspektrometrie mit <i>n</i> Massenanalyse-Experimenten
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NAP	nucleic acid purifier
Nonidet	nicht ionisches Detergens
NEPHGE	Non-Equilibrium pH-Gradient Elektrophoresis

NHS	<i>N</i> -Hydroxy-Succinimid
O.D.	optische Dichte
<i>P</i>	Leistung (power) angegeben in W
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAGIEF	Polyacrylamidgel-Isoelektrische-Fokussierung
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC	Personal Computer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFG	Pulsed Field Gel(-Elektrophorese)
PGM	Phosphoglucomutase
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Proteaseinhibitor
p <i>K</i> -Wert	Dissoziationskonstante
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPA	Piperidinopropionamid
PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>r</i>	Molekülradius
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
Rf-Wert	relative Laufstrecke
RFLP	Restriktions-Fragmente-Längen-Polymorphismus
<i>R<sub>m</sub></i>	relative elektrophoretische Mobilität
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumteil (Volumenanteil)
RuBP	Ruthenium-II-tris-bathophenantrolindisulfonat
s	Sekunde
SDS	Natrium (sodium) dodecylsulfat
SNP	single nucleotid polymorphism
SSCP	Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (single strand conformation polymorphism)
ssDNA	single strand (Einzelstrang) DNA
<i>T</i>	Totalacrylamidkonzentration (%)
<i>t</i>	Zeit (time), angegeben in h, min, s
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	Tributylphosphin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TCA	Trichloressigsäure (acid)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TF	Transferrin
ToF	Time of Flight (Flugzeit)
Tricin	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

$U$	Spannung, angegeben in V
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
$V$	Volumen, angegeben in L
$v$	Wanderungsgeschwindigkeit, angegeben in m/s
$v/v$	Volumen pro Volumen (Volumenanteil)
W	Watt
WiFi	Wireless Local Area Network (Kunstwort)
ZE	Zonenelektrophorese

# Teil I

## Grundlagen

### Übersicht

Elektrophoretische Methoden sind neben chromatografischen Methoden die meist verwendeten Trenntechniken für die Analysen von Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren und Glykanen. Mit relativ geringem apparativen Aufwand erreicht man hohe Trennleistungen. Haupteinsatzgebiete sind die Molekularbiologie, biologische und biochemische Forschung, Proteomik, Pharmazie, forensische Medizin, klinische Routineanalytik, Veterinärmedizin und Lebensmittelüberwachung. Da die getrennten DNA-Fractionen mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion („PCR“) und Proteine mit hochempfindlichen Massenspektrometriemethoden weiter analysiert werden können, vermischt sich die Einteilung in analytische und präparative Anwendungen. Aber grundsätzlich sind elektrophoretische im Gegensatz zu chromatischen Methoden zur industriellen Proteinaufreinigung nicht geeignet, weil bei der Trennung joulesche Wärme entsteht.

Als eines der ausführlichsten und am meisten praxisbezogenen Bücher über Elektrophoresemethoden sei die Monografie von Andrews (1986) empfohlen. Im vorliegenden Buch *Elektrophorese leicht gemacht* sollen die Grundlagen der Elektrophoresemethoden und ihre Anwendungen in wesentlich kürzerer Form zusammengestellt werden.

### Das Prinzip

In einem elektrischen Gleichstromfeld wandern geladene Moleküle und Partikel jeweils in die Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen. Die Probensubstanzen befinden sich dabei in wässriger Lösung. Verschiedenartige Moleküle und Partikel eines Gemisches wandern aufgrund unterschiedlicher Ladungen und Massen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und werden dabei in einzelne Fraktionen aufgetrennt.

Die elektrophoretische Mobilität, welche die Wanderungsgeschwindigkeit direkt beeinflusst, ist eine signifikante und charakteristische Größe eines geladenen Moleküls oder Partikels und ist abhängig von den  $pK$ -Werten der geladenen Gruppen und der Molekül- bzw. der Partikelgröße. Sie wird beeinflusst von Art, Konzentration und  $pH$ -Wert des Puffers, Temperatur, elektrischer Feldstärke so-

wie der Beschaffenheit des Trägermaterials. Elektrophoretische Trennungen werden entweder in freier Lösung, in trägerfreien Pufferschichten, Kapillaren oder Mikrochips oder in stabilisierenden Medien durchgeführt, wie z. B. auf Dünnschichtplatten, Folien oder Gelen. Ausführliche theoretische Grundlagen findet man im Buch „Bioanalytik“, herausgegeben von Lottspeich und Engels (2012).

Meistens findet man Angaben über die *relative* elektrophoretische Mobilität ( $m_r$  oder  $R_m$ ) von Substanzen. Dabei bezieht man sich auf die Laufstrecke einer mitaufgetrennten Standardsubstanz, um unterschiedliche Feldstärken und Trennzeiten auszugleichen.

Es gibt drei grundsätzlich verschiedene elektrophoretische Trennmethoden:

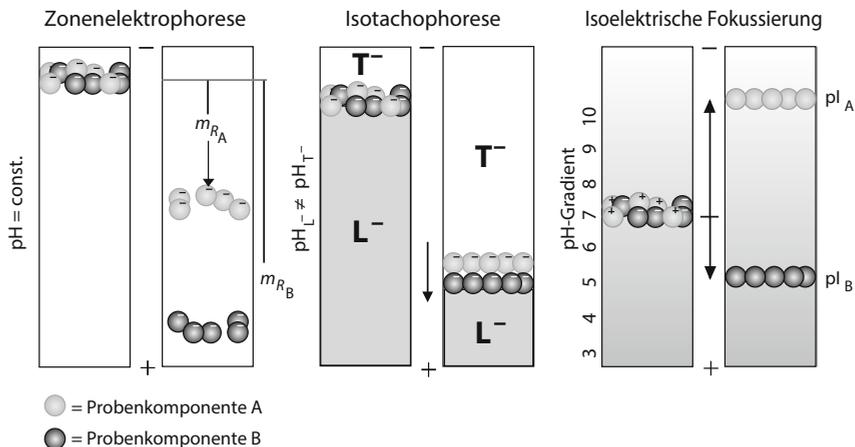
- Elektrophorese, korrekterweise Zonenelektrophorese genannt,
- Isotachophorese,
- Isoelektrische Fokussierung.

Blotting ist keine Trenn-, sondern eine Nachweismethode.

In Abb. 1 sind die drei Trennprinzipien dargestellt.

*Zu a):* Bei einfachen *Elektrophoresen* verwendet man homogene Puffersysteme, die über die gesamte Trenndistanz und -zeit den gleichen pH-Wert gewährleisten. Die in einem definierten Zeitabschnitt zurückgelegten Wanderungstrecken sind damit ein Maß für die elektrophoretische Mobilität der verschiedenen Substanzen. Dies gilt auch für die Disk-Elektrophorese; das diskontinuierliche System existiert nur zu Beginn und verwandelt sich dann von selbst in ein homogenes.

*Zu b):* Bei der *Isotachophorese* (ITP), auf Deutsch Gleichgeschwindigkeitslektrophorese, wird die Trennung in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Die ionisierten Probensubstanzen wandern zwischen einem „schnellen“ Leitenelektrolyten (L) und einem „langsamen“ Folgeionenelektrolyten (T, von *terminierend*) mit gleichen Geschwindigkeiten. Dabei sortieren sich die verschiedenen Probenkomponenten nach ihrer elektrophoretischen Mobilität auseinander



**Abb. 1** Die drei elektrophoretischen Trennprinzipien. Nähere Erläuterungen im Text.

und bilden einen Stapel: Die Substanzen mit der höchsten Mobilität folgen direkt dem Leitton, die mit der niedrigsten Mobilität wandern direkt vor dem Folgeion. Diese Methode wird hauptsächlich für quantitative Analysen eingesetzt.

Die ITP wird im Vergleich zu sonstigen elektrophoretischen und chromatografischen Trennungen als exotisch eingeschätzt, weil sich keine Zwischenräume zwischen den Zonen ergeben; die Banden sind keine „Peaks“ (gaußsche Verteilung), sondern „Spikes“ (konzentrationsabhängige Breiten).

*Zu c): Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) findet in einem pH-Gradienten statt und kann ausschließlich mit amphoteren Substanzen, wie Peptiden und Proteinen, durchgeführt werden. Die Moleküle wandern hierbei – je nach Ladung – in Richtung Anode bzw. Kathode, bis sie im Gradienten an dem pH-Wert ankommen, wo ihre Nettoladung null ist.*

Dieser pH-Wert ist der *isoelektrische Punkt* kurz pI, der jeweiligen Substanz. Da sie dort nicht mehr geladen sind, hat das elektrische Feld keinen Einfluss mehr auf sie. Entfernen sie sich – aufgrund von Diffusion – von dieser Stelle, erhalten sie wieder eine Nettoladung und werden durch das elektrische Feld wieder auf ihren pI zurücktransportiert. Das ergibt einen Konzentrierungseffekt; daher der Name *Fokussierung*.

Bei der IEF ist es wichtig, die optimale Stelle im pH-Gradienten für den Probenauftrag zu ermitteln und zu verwenden, da manche Proteine bei bestimmten pH-Werten instabil sind oder zum Aggregieren neigen.

## Anwendungsbereich

Man verwendet diese Methoden für die qualitative Charakterisierung einer Substanz oder eines Substanzgemisches, für Reinheitsprüfung, Gehaltsbestimmungen und mikropräparative Zwecke.

Der Anwendungsbereich erstreckt sich von ganzen Zellen und Partikel über Nukleinsäuren, Proteine, Peptide, Aminosäuren, organische Säuren und Basen, Drogen, Pestizide bis zu anorganischen Anionen und Kationen – kurz: über alles, was Ladungen tragen kann.

## Die Probe

Ein wichtiges Kriterium zur Auswahl der geeigneten Elektrophoresemethode ist die Art der Probesubstanzen, die analysiert werden sollen. In den Probenlösungen dürfen keine festen Partikel oder Fetttropfen suspendiert sein, weil diese die Trennung stören, indem sie die Poren der Matrix verstopfen. Meist werden die Probenlösungen vor der Elektrophorese zentrifugiert. Problemlos sind im Allgemeinen Trennungen von Substanzen, die ausschließlich negativ oder positiv geladen sind.

Die *Probenaufgabe* erfolgt bei Gelen, die sich unter Puffer befinden, wie z. B. Vertikal- und Submarine-Systemen, mit Spritzen in vorgeformte *Geltaschen* oder in Glasröhrchen durch Unterschichten der mit Glycerin oder Saccharose beschwerten Probe unter den Puffer.

Beispiele solcher Anionen oder Kationen sind: Nukleinsäuren, Farbstoffe, Phenole, organische Säuren oder Basen. Amphotere Moleküle wie Aminosäuren, Peptide, Proteine und Enzyme haben je nach dem pH-Wert des Puffers positive oder negative Nettoladung, weil sie sowohl saure als auch basische Gruppen besitzen.

Makromoleküle, wie Proteine und Enzyme, sind teilweise gegenüber bestimmten pH-Werten oder Puffersubstanzen empfindlich, es können Konfigurationsänderungen, Denaturierungen, Komplexbildungen und zwischenmolekulare Wechselwirkungen auftreten. Dabei spielen auch die Substanzkonzentrationen in der Lösung eine Rolle. Besonders beim Eintritt der Probensubstanzen in eine Gelmatrix können leicht Überladungseffekte auftreten, wenn die Probenkonzentration beim Übergang von der Lösung in das stärker restriktive Gel einen kritischen Wert überschreitet. Bei der Natriumdodecylsulfat (SDS)-Elektrophorese muss die Probe vorher denaturiert, d. h., die Probenmoleküle müssen in die Form von Molekül-Detergens-Mizellen gebracht werden. Die Methode der selektiven Probenextraktion bzw. die Extraktion von schwer löslichen Substanzen bestimmt häufig die Art des verwendeten Elektrophoresepuffers.

Bei offenen Oberflächen wie bei Horizontalsystemen (z. B. in der Celluloseacetat-, Agarosegel- und automatisierten Elektrophorese) verwendet man *Probenapplikatoren* oder pipettiert mit Mikroliterpipetten in Schlitzmasken, Lochbänder oder vorgeformte Gelwannen. Bei Kapillar- und Mikrochiptechniken verwendet man ebenfalls Spritzen, die meisten Geräte haben jedoch eine automatische Probenabgabe.

### Der Puffer

Die elektrophoretische Trennung von Substanzgemischen erfolgt bei einem genau eingestellten pH-Wert und bei konstanter Ionenstärke des Puffers. Die Ionenstärke des Puffers wird möglichst niedrig gewählt, dann sind der Anteil der Probeionen am Gesamtstrom und damit ihre Wanderungsgeschwindigkeiten genügend hoch.

Die Pufferionen werden während der Elektrophorese ebenfalls – wie die Probeionen – durch das Gel transportiert: negativ geladene zur Anode und positiv geladene zur Kathode. Man will mit möglichst geringer Leistung auskommen, damit während der Elektrophorese nicht zu viel joulesche Wärme entsteht. Es ist aber eine Mindestpufferkapazität erforderlich, damit der pH-Wert der Probesubstanzen keinen Einfluss auf das System nehmen kann.

Für die Aufrechterhaltung konstanter pH- und Pufferbedingungen müssen die Volumina der Elektrodenpuffervorräte genügend groß sein. Sehr praktisch, wenn auch nur in horizontalen Trennsystemen möglich, ist die Verwendung von Gel-Pufferstreifen oder -dochten. Man verwendet bei anionischen Elektrophoresen sehr basische, bei kationischen Elektrophoresen sehr saure Puffersysteme.

Bei Vertikal- und Kapillarsystemen wird der pH-Wert so eingestellt, dass möglichst alle vorhandenen Probesubstanzmoleküle entweder negativ oder positiv geladen sind, sodass sie im elektrischen Feld in die gleiche Richtung wandern.