

Stundenprotokoll vom Mittwoch, 15. Januar 2003

Es fehlen: keine

Proteine – Proteinstrukturchemie

Isolierung/Präparation von Proteinen

1. Methode: Ausfällung durch reversible Aussalzung

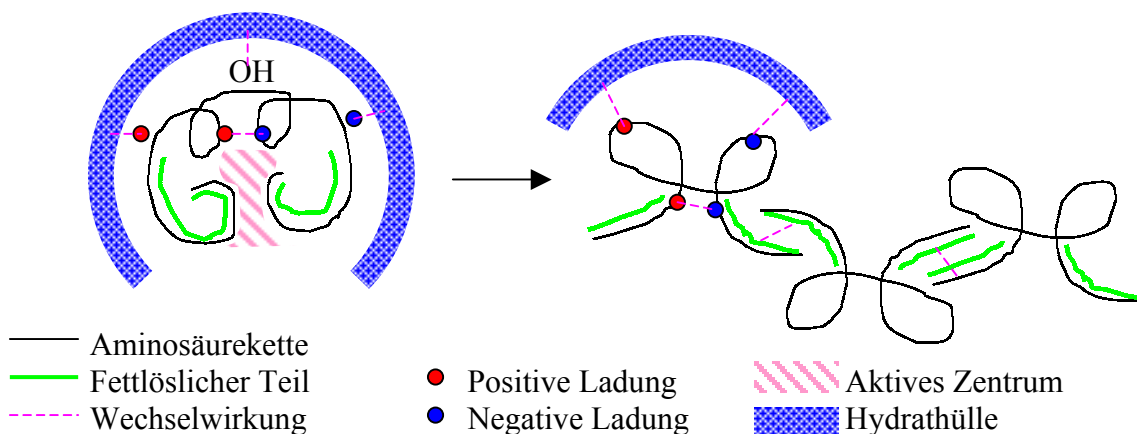
Membraneiweiße besitzen eine andere Löslichkeit als Eiweiße, die in wässriger Umgebung vorliegen. Je nach Tertiärstruktur befinden sich außen viele polare hydrophile oder unpolare hydrophobe Aminosäuren. Auch geladene Aminosäuren, wie die saure Glutaminsäure oder die basische Aminosäure Lysin können über Ion/Dipol-Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen in Verbindung treten und erzeugen damit eine große Hydrathülle und machen das Eiweiß insgesamt wasserlöslich. Eine unpolare Aminosäure wäre z.B. Phenylalanin. (Siehe auch gelbes Buch S.373)

Wenn man eine gesättigte Salzlösung in hoher Konzentration der Eiweißlösung hinzugibt, passiert folgendes:

Zum einen verdrängen die Salzionen die Wassermoleküle aus der zweiten und weiter äußeren Schale der Hydrathülle vom Eiweiß. Die Ionen können sich fester an die Dipole des Eiweißes oder an die Ladungen binden als Wasser, da Wasser nur ein Dipol, die Salzionen Ionen sind. Ion/Ion bzw. Ion/Dipol-Bindungen sind stärker als Dipol/Ion bzw. Dipol/Dipol-Bindungen. Eine kleine Hydrathülle bleibt aber immer erhalten, vor allem die Wassermoleküle in der ersten Schale der Hydrathülle werden eigentlich nicht verdrängt.

Zum anderen treten die Salzionen in Konkurrenz mit den Eiweißen um die Wassermoleküle. Es handelt sich immer um eine gesättigte Salzlösung und durch die hohe Konzentration möchten die Salzionen eine größere Hydrathülle haben sobald dies möglich ist. In der Eiweißlösung befinden sich viele freie Wassermoleküle und auch Hydrathüllenwasser vom Eiweiß. Da die Salzionen oft sehr klein gegenüber dem Eiweiß sind, kann die Ladung eines Salzion mehr Wasser an sich binden. Die Salzionen bildet um sich folglich eine sehr große Hydrathülle. Dabei muss das Eiweiß z.T. auf sein Hydrathüllenwasser verzichten, da die Salzionen stärker das Wasser an sich bindet und sogar dem Eiweiß welche entzieht.

Außerdem werden die intramolekularen Bindungen beeinflusst. Ion/Ion (Salzbrücken) werden getrennt. Das Eiweiß kann „umgestülpt“ werden:



Es entstehen andere Bindungen, wie z.B. die intramolekulare Wechselwirkung zwischen einer positiven und negativen Ladung. Diese stabilisieren nun die andere Form. Zudem liegen nun die fettlöslichen Teile außerhalb und können in Wechselwirkung mit anderen Molekülen treten und große Verbände bilden. Das aktive Zentrum ist durch diese „Umstülpung“ nicht mehr vorhanden, das Eiweiß kann deswegen nicht mehr seinen Zweck als Enzym nachgehen, es wurde denaturiert.

Weitere irreversible Denaturierung wird durch Schwermetalle, Hitze, Säure- oder Basenbehandlung erreicht. Dabei wird immer das aktive Zentrum zerstört und kann nicht wiederhergestellt werden. Das Enzym (Eiweiß) würde damit zerstört werden und unbrauchbar sein.

Um ein Eiweiß zu isolieren, benutzt man zur Ausfällung immer eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Dabei kann durch entsprechender Wasserzugabe die Fällung wieder rückgängig gemacht werden, ohne dass das Eiweiß zerstört wird. Dies wird z.B. auch bei der ADH-Isolierung angewendet.


2. Methode: Molekularsiebchromatographie

Eine spezielle Gelchromatographie. Durchgeführt wird der Vorgang in einer Säule mit verschiedenen Gelkörnern als stationäre Phase. Diese Körner sind porös und haben unterschiedlich große Poren. So gelangen kleine Moleküle in das Innere der Körner, größere schwimmen jedoch einfach außen herum. Die großen Moleküle legen damit einen kürzeren Weg in der Säule zurück und kommen unten als erste heraus. Diese Methode ist auch für riesige Mengen verwendbar.

3. Methode: Gelelektrophorese

Diese Methode ähnelt der 2. Methode, ist aber nur auf kleine Mengen anwendbar.

Der Aufbau ist rechts schematisch dargestellt.

In dieser Methode nutzt man die sogenannte Nettoladung jedes Eiweiß aus. Auf einem Gelbett () wird die Probe entlang einer Linie aufgetragen. Das Gelbett, sowie die links und rechts anschließenden Kanäle werden mit Wasser benetzt und es wird eine hohe Spannung angelegt,

so dass eine Wasserkühlung erforderlich ist. Die aufgetragene Eiweiße wandern dann entgegengesetzten Ladung. Positive Eiweiß zur negativen Ladung und negativ geladene Eiweiße, von denen es mehr gibt, wandern zum positiven Pol. Nach einiger Zeit bilden sich verschiedene Banden, in denen sich immer nur ein Eiweiß mit der gleichen Nettoladung befindet. Um diese Banden sichtbar zu machen, schneidet man einen Längsstreifen aus dem Gelbett und behandelt ihn mit der Biuret-Lösung, die die Eiweiße färbt. Nun kann man einzelne Querstreifen rausschneiden, um das gewünschte Eiweiß in einem Band zu isolieren.

