

Analyse von Proteomen - Multidimensionale Kapillar-HPLC

zur Isolierung aktiver Enzyme (am Beispiel der β -Galactosidase)

Christoph Dammer, Peter Földi, Anna Nickisch-Hartfiel
HS-Niederrhein, Fachbereich Chemie/Biotechnologie

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde die Miniaturisierung der HPLC forciert. Durch Kapillar- bzw. Nano-HPLC lässt sich die Nachweisempfindlichkeit um das 8000-fache gegenüber der konventionellen HPLC steigern [7]. Beispielhaft wird eine Kaskade chromatographischer Verfahren zur Aufarbeitung der β -Galaktosidase aus *E. coli*, *DSM-Nr.498* vorgestellt.

Einleitung

Dem Biochemiker stehen zur Trennung und Charakterisierung von Proteinen und Nukleinsäuren elektrophoretische und chromatographische Techniken zur Verfügung. Mit Hilfe der 2-D-Gel-Elektrophorese ist eine Auftrennung von bis zu tausend Proteinen gleichzeitig möglich. Nachteilig bei dieser Technik sind die lange Versuchsdauer und der relativ hohe Arbeitsaufwand. Zudem können kleinere Proteine ($\leq 10\ 000$ Da) und Peptide nicht erfasst werden. Außerdem verlieren Proteine während der Trennung ihre biologische Aktivität.

Chromatographische Techniken wie sterische Ausschluss- (SEC), Ionenaustausch- (IEX), Hydrophobic-Interaction- (HIC) und Reversed-Phase-Chromatographie (RPC) ermöglichen eine Trennung von Proteingemischen. Diese Trennverfahren können analytisch, präparativ und selbst im großtechnischen Maßstab durchgeführt werden. Sie sind einfach in der Handhabung, schnell durchführbar, reproduzierbar und weisen eine hohe Empfindlichkeit auf. Auch kleine Proteine ($<10\ 000$ Da), Peptide und Aminosäuren lassen sich analytisch und präparativ trennen und detektieren [1, 2,3,4,]. Eine Denaturierung erfolgt bei optimal abgestimmter Arbeitsweise nicht, so dass im Anschluss biochemische Tests mit biologisch aktiven Proteinen durchgeführt werden können.

alternativ zur 2-D-Gelelektrophorese lassen sich Proteine chromatographisch trennen

→ analytisch
→ präparativ

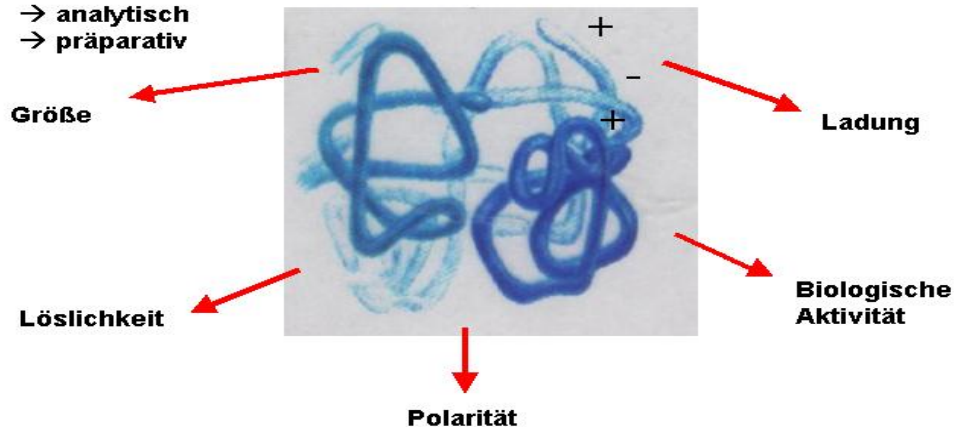


Abb. 1 Chromatographische Trennsprinzipien von Proteinen

In den letzten Jahren wurde die Miniaturisierung der HPLC forciert. Durch Kapillar- bzw. Nano-HPLC lässt sich die Nachweisempfindlichkeit um das 8000-fache gegenüber der konventionellen HPLC steigern [7].

Anhand einer in der Biotechnologie häufig auftretenden Fragestellung - nämlich der Nachweis von intrazellulär gebildeten Proteinen - sollte gezeigt werden, ob durch mehrdimensionale Nano-HPLC, d.h. durch eine Kaskade gezielt ausgewählter chromatographischer Trennschritte die Aufarbeitung, Detektion und Analyse von Proteinen ermöglicht wird und sie in der Proteinanalytik als Alternative zur Gel-Elektrophorese etabliert werden kann.

Material und Methoden:

Als Modellorganismus wurde *E. coli*, DSM-Nr.498, ATCC23716 gewählt, der bei Wachstum in glucosefreiem, laktosehaltigem Mineralsalz-Medium [1] u. a. das Enzym β -Galaktosidase bildet, das Laktose in Glucose und Galactose spaltet. Die Anzucht der Zellen wurde im Bioreaktor Biostat[®]-B der Firma Sartorius BBI Systems mit Prozess-Leitsystem Micro DCU Twin durchgeführt (Temperatur: 37 °C; 400 rpm; Begasung: 2 vvm; pH-Wert: 7) Die Zellen wurden mit einer Crossflow-Anlage QuixStand benchtop system der Firma Amersham Biosciences; Membran:CFP1E4MA- Microfiltration, Porengröße 0,1 μ m, Filterfläche 0,042 m² aufkonzentriert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (Phosphatpuffer: 0,1 mol/L; pH 7 mit β -Mercaptoethanol) (Ultraschallgerät der Firma B. Braun Biotech International; HIGH, 5 min). Der Aktivitätsnachweis der β -Galaktosidase wurde mit o-Nitrophenyl-galactopyranosid (ONPG) durchgeführt (Spektroskopie bei 420 nm) [8].

Nach der **Ammoniumsulfatfällung** [8] wurden folgende chromatographische Trennverfahren eingesetzt:

Chromatographische Trennung der Proteine wurde im präparativen Maßstab mit dem ÄKTAbasic-System der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Zur Analyse mittels Kapillar-HPLC wurde das HPLC-System der Fa. Sunchrom, Friedrichsdorf, eingesetzt

In Tabelle 1 sind die Säulen aufgeführt, die bei der beispielhaft vorgestellten Kaskade eingesetzt wurden. Die Kapillarsäulen wurden von der Firma Grom zur Verfügung gestellt.

Tab. 1 verwendete Säulen

Säule	Hersteller	Kaskadenschritt
Superdex 200	Amersham Biosciences	SEC
TSK-Bioassist Q	Tosoh-Bioscience	IEX
TSK-Bioassist Q [Kapillare]	stationäre Phase: Tosoh-Bioscience gepackt von: Grom HPLC Analytik	
TSK-SuperSW2000	Tosoh-Bioscience	Resalting
TSK-SuperSW3000 [Kapillare;L=30cm]	stationäre Phase: Tosoh-Bioscience gepackt von: Grom HPLC Analytik	
TSK-Phenyl 5PW	Tosoh-Bioscience	HIC
TSK-Phenyl 5PW [Kapillare]	stationäre Phase: Tosoh-Bioscience gepackt von: Grom HPLC Analytik	

Ergebnisse und Diskussion:

Das folgende Fließschema (Abb. 2) gibt eine Übersicht aller Verfahrensschritte wieder, die beginnend mit der Fermentation von *E. coli* über die präparativen Aufarbeitung bis zum analytischen Nachweis mittels Kapillar-Chromatographie durchgeführt wurden.

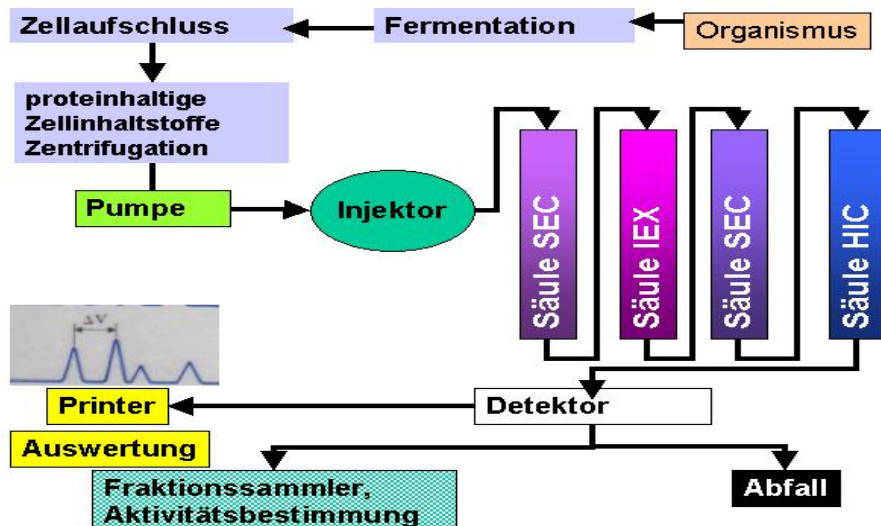


Abb. 2 Fließschema: Multidimensionale HPLC zur Trennung und Nachweis der β -Galactosidase

Nach dem Zellaufschluss und der Ammoniumsalzfällung wurde das β -Galactosidase-haltige Präzipitat durch eine **sterische Ausschlusschromatographie** (Superdex 2000) von allen Proteinen getrennt, deren Molekulargewicht kleiner als 10^6 Da war. Die β -Galactosidase lag nach der **Ionenaustausch-Chromatographie** (Matrix -TSK Bioassist Q), einem **Resalting** Schritt (TSK SuperSW2000) (Abb.3) und einer **hydrophobic-Interaction Chromatographie** (TSK Phenyl-5PW) in einer aufgereinigten biologisch aktiven Form vor.

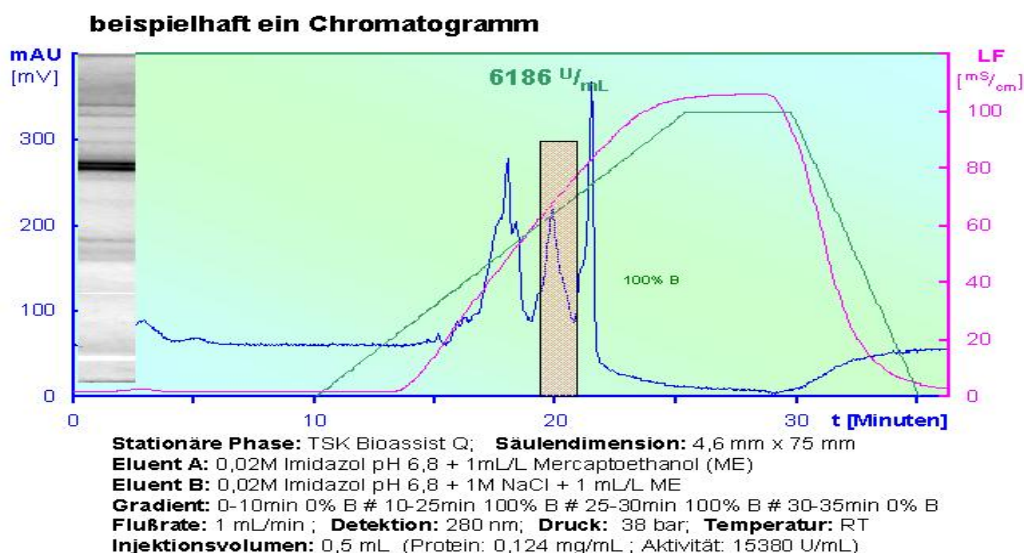


Abb. 3 Anreicherung der β -Galactosidase auf TSK-Bioassist Q Resalting

Dies konnte durch die Bestimmung der β -Galactosidase Aktivität ermittelt werden. Die Reinheit wurde mittels Gel-Elektrophorese kontrolliert (Abb. 4). Im Elektrogramm wird deutlich, dass durch jeden chromatographischen Trenn-

schrift Fremdproteine entfernt wurden. Ein Transfer dieser Kaskade von der präparativen auf die Kapillar-Chromatographie war erfolgreich [9].

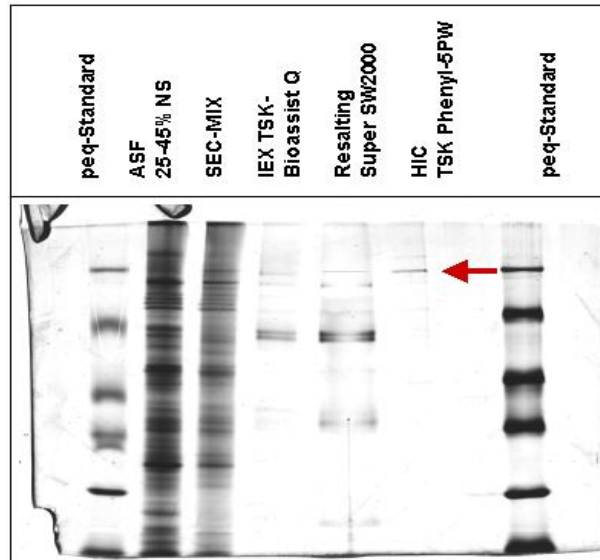


Abb. 4 SDS-Elektropherogramm aufgetragen wurde nach jede Kaskade die β -Galaktosidase-haltige Fraktion; \blacktriangle Position der β -Galactosidase

Ausblick

Durch die Kapillar-Chromatographie können bei der Verwendung von Säulen mit einem Innendurchmesser von 300 μm Proteinkonzentrationen von 0,02 ng effizient getrennt und detektiert werden (≥ 3 -faches Signal/Rauschverhältnis). Somit liegt die Nachweisgrenze von Proteinen mittels Kapillar-HPLC um den Faktor ≤ 100 -fach niedriger als bei der 2-D-Elektrophorese [7].

Ein weiterer Vorteil der chromatographischen Trennverfahren (HPLC) ist darin zu sehen, dass in einem einzigen Arbeitsgang Proteine „umgesalzt“ oder „entsalzt“, sowie deren Molekulargewicht bestimmt werden können [6]. Sie werden dabei gereinigt bzw. angereichert und bleiben biologisch überwiegend aktiv.

Mit biologisch aktiven Proteinen können weitere Untersuchungen durchgeführt werden wie z. B. Bestimmung der Enzymaktivität und Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Pharmaka.

Die Nachweisgrenze bei der Kapillar-HPLC ist wesentlich niedriger, so dass Abbau oder Veränderungen während der Aufarbeitung (down stream-Prozess) sowie die Reinheit von Proteinen in wesentlich geringeren Konzentrationen als mit der klassischen HPLC nachgewiesen werden können.

- [1] Y. Kato et. al Chromatogr., 266, 341-349 (1983)
- [2] L. Graeve, P. Földi, J. Kruppa: Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 1559-1565 (1982)
- [3] L. Graeve, P. Földi, J. Kruppa: LC-Magazine, 2, 848-853 (1984)
- [4] Dornburg, P. Földi, P. H. Hofschneider, J. of Chromatogr., 296, 379-385 (1984)
- [5] H.P. Schmauder, Methoden der Biotechnologie, (1sted.), Fischer Verlag, 1999ff. (1994)
- [6] L. Lottspeich, H. Zbras (Hrsg.) Bioanalytik (1st ed.) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 201 ff. (1998)
- [7] C. Klein, P. Földi: Labor Praxis, 2 34-38 (2002)
- [8] Praktikumsvorschriften für das Bioverfahrenstechnische Praktikum der HS-Niederrhein FB 01/Schwerpunkt BT
- [9] Christoph Dammer, Peter Földi: Labor Praxis, 10 30-32 (2005)