

# Aktuelle Methoden der Proteinchromatografie

## Einleitung



In den zwei Wochen dieses Praktikums werden Sie Gelegenheit haben, sich intensiv mit zeitgemäßen Methoden der Proteinchromatografie zu befassen. Dazu stehen Ihnen sechs Arbeitsplätze mit modernen Niederdruck-Flüssigchromatografieanlagen, chromatografischen Säulen und Materialien zur Verfügung.

In technischer Hinsicht werden chromatografische Anlagen gemeinhin nach ihrem Druckbereich und dem verwendeten Lösungsmedium unterschieden. Für native (gefaltete) Proteine wird praktisch ausschließlich Wasser als Lösungsmittel im unteren und mittleren Druckbereich (bis ca. 50 bar) verwendet. Anlagen, die höhere Drücke (einige hundert bar) liefern, werden als HPLC (high pressure liquid chromatography, oder neuerdings high performance liquid chromatography)- Systeme bezeichnet. Solche Anlagen sind durchaus auch für viele Aspekte der Proteinchromatografie einsetzbar. Jedoch existieren auf die Proteinreinigung spezialisierte Chromatographiesysteme. Für diese hat sich die Bezeichnung FPLC eingebürgert. Letztere wurde von der schwedischen Firma Pharmacia als Markenname und Abkürzung für „fast performance liquid chromatography“ eingeführt. Die Bezeichnung FPLC wird mittlerweile weithin verwendet, um Nieder- und Mitteldrucksysteme von HPLC-Geräten abzugrenzen. Ein breites Anwendungsfeld findet daneben auch die Gaschromatografie (GC) mit gasförmiger mobiler Phase. GC ist naturgemäß aber nicht für Proteine einsetzbar.

Die Druckanforderungen an das maschinelle Equipment werden im Wesentlichen durch die verwendeten Chromatografiematerialien diktiert. Für die Trennung von Proteingemischen findet hier vor allem quervernetztes Agarose als Trägersubstanz weite Verbreitung. Sie werden in diesem Kurs derartige Material als „Sephadex-beads“, ein Handelsname der Firma Pharmacia/General Electric intensiv kennenlernen. Dem Einsatzzweck entsprechend wird das Trägermaterial durch Derivatisierung mit chemischen Seitenketten weiter modifiziert. Für Anionentauscher sind hier die „Q“-Seitenkette (quaternäres Ammoniumion + Spacer) und für Kationentauscher die „SP“- (Sulfopropyl-) Seitenkette und für Hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC) z. B. Phenyl-, Octyl- u. ä. Seitenketten gebräuchlich.

Die Druckanforderungen an das maschinelle Equipment werden im Wesentlichen durch die verwendeten Chromatografiematerialien diktiert. Für die Trennung von Proteingemischen findet hier vor allem quervernetztes Agarose als Trägersubstanz weite Verbreitung. Sie werden in diesem Kurs derartige Material als „Sephadex-beads“, ein Handelsname der Firma Pharmacia/General Electric intensiv kennenlernen. Dem Einsatzzweck entsprechend wird das Trägermaterial durch Derivatisierung mit chemischen Seitenketten weiter modifiziert. Für Anionentauscher sind hier die „Q“-Seitenkette (quaternäres Ammoniumion + Spacer) und für Kationentauscher die „SP“- (Sulfopropyl-) Seitenkette und für Hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC) z. B. Phenyl-, Octyl- u. ä. Seitenketten gebräuchlich.

Für die Größenausschlusschromatografie („Gelfiltration“) werden chemisch nahe verwandte Materialien verwendet. Wir werden hier mit Sephacryl (Markenname von General Electric), einem N,N'-Methylenbisacrylamid-vernetzten Allyldextran arbeiten. Die entscheidende Charakteristik von Gelfiltrati-

onsmaterialien ist eine bestimmte, relativ kleine Porengröße gemessen an biologischen Makromolekülen. Kleine Moleküle dringen daher in solche Materialien ein, große Makromoleküle werden ausgeschlossen, dazwischen befindet sich der nutzbare Trennbereich des Gelfiltrationsmaterials.

Bitte beachten Sie, dass –entgegen einer weitverbreiteten Darstellungsweise in Abbildungen- nahezu sämtliches Chromatografiematerial porös ist und der Hauptanteil der Bindung sich im Inneren und nicht an der Oberfläche der Materialkügelchen („beads“) abspielt. Dementsprechend ist für Ionentauscher- und HIC-Materialien eine relativ große Porengröße nötig, um einen Kapazitätsverlust bei der Bindung großer Moleküle zu vermeiden.

Von chromatografischen Säulen wird eine möglichst hohe Trennschärfe gefordert. Diese erreicht man durch eine gleichmäßige Packung und Größenverteilung der Materialkügelchen. Daneben sollten in dieser Hinsicht die Kügelchen möglichst klein sein.

Eine andere Forderung sind darüber hinaus hohe Durchflussgeschwindigkeiten auf der gepackten Säule. Diese erzielt man durch den Einsatz hoher Drücke, was in der Forderung nach hoher Druckstabilität resultiert. Da letzterer natürlich enge Grenzen gesetzt sind, muss auf der anderen Seite der anliegende Rückdruck möglichst klein gehalten werden. Dies wiederum wird durch möglichst große und wiederum möglichst einheitliche Größe der Materialkügelchen erreicht. Wir sehen also, dass hier widerstrebende Anforderungen in einem Produkt verwirklicht werden müssen.

Im Folgenden nochmals eine Zusammenfassung der gewünschten Eigenschaften von proteinchromatografischen Material:

1. Einheitliche Größe der Kügelchen und geringe Abweichung von der Kugelform
2. Größe möglichst klein für hohe Auflösung, aber möglichst groß für niedrigen Rückdruck
3. Hohe chemische Stabilität, diese resultiert in guter Regenerierbarkeit und damit Langzeitstabilität
4. Große innere Oberfläche für hohe Bindekapazitäten
5. Hohe Druckstabilität
6. Geringe Proteininteraktion des Materials an sich, diese wird erst durch die spezifische chemische Modifikation erreicht.

Punkt 2 stellt offensichtlich einen Widerspruch an sich dar, deshalb muss hier zwangsweise ein Kompromiss zwischen Auflösung und erreichbarer Flussrate eingegangen werden. Wo dieser angesiedelt ist, hängt vom Anwendungszweck ab. Für Sepharosematerial existieren deshalb zwei Größenvarianten: Fast Flow (FF, durchschnittliche Partikelgröße 90  $\mu\text{m}$ ) für hohe Flussraten und High Performance (HP, durchschnittliche Partikelgröße 34  $\mu\text{m}$ ) für hohe Auflösung.

Am Anfang des Praktikums werden Sie sich zunächst einmal mit dem Aufbau und der Handhabung Ihrer FPLC-Maschine vertraut machen. Der prinzipielle Aufbau einer solchen wird deshalb im Folgenden am Beispiel des im Praktikum verwendeten Äkta start-FPLC-Systems erläutert (siehe Abb. 1).

Das Herz eines Chromatographiesystems und gleichzeitig die Hauptdeterminante seiner Eigenschaften ist die Pumpe (4). In unserem System ist sie als Schlauchpumpe ausgeführt. Die Vorteile dieser Ausführung sind einfachste Wartung und niedrige Kosten. Nachteile sind niedriger Maximaldruck und Volumenstrom. Gehen wir nun alle Elemente in Richtung des Flüssigkeitsstroms durch. Zunächst besteht die Möglichkeit, Puffer aus wahlweise zwei Einlässen A und B durch das Pufferventil (1) anzusaugen.

Intervallweise Umschaltung dieses Ventils bietet in Zusammenarbeit mit dem Mischer (2) die Möglichkeit, beliebige Mischungsverhältnisse zwischen Puffer A und B, also auch Gradientenverläufe herzustellen. Ein Proben (Sample) –Ventil bietet unmittelbar vor der Pumpe (4) die Möglichkeit, über ein geringes Totvolumen Proben anzusaugen und unter Druck auf die Säule zu bringen. Der Drucksensor (5) ist unerlässlich, um System und Säulen vor möglichen Drucküberschreitungen und daraus resultierendem Schaden zu schützen. Das Waschventil (6) bietet die Möglichkeit, Pumpe und Leitungen zu spülen, ohne dabei die Säule zu durchströmen. Über das das Injektionsventil (7) lässt sich eine Probe druckfrei in die Probenschleife (sample loop) injizieren und danach unter Druck auf die Säule auftragen. Das Injektionsventil wird bei unserer Geräteausführung manuell geschaltet. Bei kleinen Probenvolumen und Gelfiltrationssäulen sollte prinzipiell über das Injektionsventil und nicht über Probenventil und Pumpe geladen werden. Direkt hinter das Injektionsventil wird die chromatografische Säule geschaltet. Am Säulenausgang folgt dann der UV-Detektor (8), der die Probenabsorption kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 280 nm – dem Absorptionsmaximum von Proteinen – misst. Vor dem UV-Detektor schließt sich die Leitfähigkeitsmesszelle (9) an. Die elektrische Leitfähigkeit lässt Rückschlüsse auf die Ionenstärke zu, dies ist vor allem für die Charakterisierung des Bindungsverhaltens an Ionentauscher- und HIC-Säulen wichtig. Über das Ausgangsventil lassen sich Proben wahlweise im Probensammler auffangen oder entsorgen (waste).

Sie werden sich am Anfang der ersten Praktikumswoche zunächst an Ihrem Gerät einarbeiten und dabei die Bestimmung physikalisch-technischer Parameter wie z. B. die Systemauflösung als Zahl der theoretischen Böden kennenlernen. Danach werden Sie das Erlernte an einem echten Proteingemisch anwenden, wir werden hier zunächst farbige Proteine einsetzen. Die Trennungsvorgänge lassen sich dadurch einfach und eindrucksvoll beobachten. In der zweiten Woche dürfen Sie dann die Reinigung eines in Bakterien überexprimierten und mit GFP (green fluorescent protein) markierten Proteins vornehmen, derartige Reinigungsaufgaben sind eine häufige Problemstellung in der täglichen Laborarbeit. Auch dieses Fusionsprotein ist aufgrund seiner auffälligen Fluoreszenz ausgesprochen attraktiv, um grundlegende Erfahrungen zu sammeln.

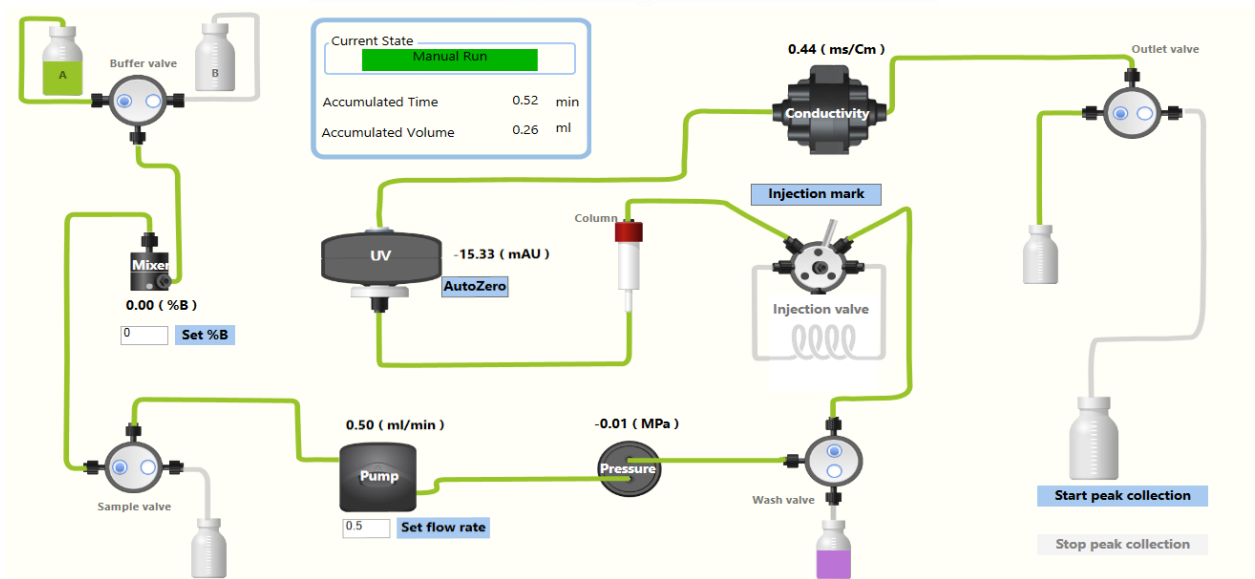
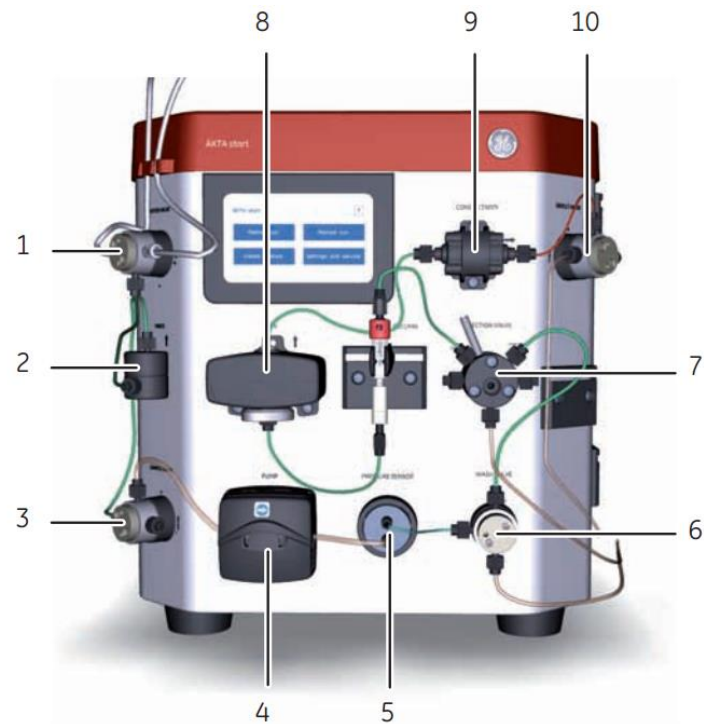


Abb. 1: Aufbau des Äkta start-FPLC Systems. Oben: Ansicht des Geräts. (1) Pufferventil, (2) Mixer, (3) Probenventil, (4) Pumpe, (5) Drucksensor, (6) Waschventil, (7) Injektionsventil, (8) photometrische UV-Messzelle, (9) Leitfähigkeitsmesszelle, (10) Ausgangsventil. Unten: Prozessansicht.

# Durchführung

## Tag 1

### Einführung in die Handhabung Ihrer FPLC-Maschine

Wir machen uns heute zunächst mit der Ausrüstung vertraut. Den prinzipiellen Aufbau Ihrer FPLC-Maschine haben Sie schon im Einleitungskapitel kennengelernt. An Ihrem Arbeitsplatz finden Sie zudem das Maschinenhandbuch und weiteres Zubehör wie Leitungen (Tubing), Adaptoren und natürlich Leersäulen, die wir mit Chromatografiematerialien befüllen werden. Die Ihnen zur Verfügung gestellte Ausrüstung hat pro Arbeitsplatz den Gegenwert eines Mittelklasseautos. Bitte behandeln Sie sie entsprechend sorgfältig und beherzigen Sie folgende Grundsätze:

1. Alle Lösungen, Puffer und Lösungsmittel, die an die Maschine angeschlossen werden, sind zu filtrieren. Dazu stehen Wasserstrahlpumpen und wiederverwendbare Filterhalter zur Verfügung. Ausgenommen sind hiervon nur Proteinlösungen und Lysate, diese sind stattdessen möglichst hochtourig zu zentrifugieren.
2. Alle Säulenmäntel und das darin gepackte Material haben Drucklimits. Das jeweils niedrigere ist ausschlaggebend. Setzen bzw. überprüfen Sie als ersten Schritt in einem Lauf das korrekte Drucklimit. Schlagen Sie die entsprechenden Drucklimits im Anhang oder den entsprechenden (Online-) Handbüchern nach.
3. Die Maschine und die Säulen dürfen nie offen herumstehen oder gar längere Zeit offen gelagert werden. Geöffnete Verbindungen an der Maschine sind schnellstmöglich wieder zu verschließen. Gepackte Säulen werden während der Lagerung mit einem unter Druck stehenden Reservoir (Federspritze) vor Austrocknung geschützt. Ausgenommen sind hiervon nur kleinere (1ml), verschweißte Ausführungen, wie Sie in Ihrem ‚HIC Selection Kit‘ vorkommen.
4. Säulen sind beim Packen mit dem Typ des verwendeten Materials eindeutig zu beschriften.
5. Eine Leckage, und sei sie noch so klein, gehört nicht zu den normalen Betriebszuständen des Chromatographiesystems. Sollte eine Leckage auftreten, ist diese sofort zu lokalisieren, der Lauf zu pausieren, die Ursache zu beheben und die Maschine und Umgebung sorgfältig zu trocknen. Eine eventuell nicht behobene Leckage fällt so sofort auf. Auch Salzverkrustungen deuten auf schleichende Leckagen hin und sind entsprechend zu behandeln.
6. Eine Auskristallisation innerhalb des Systems und auf Säulen ist unbedingt zu vermeiden. Eine solche kann z. B. durch Vermischung von Hochsalzpuffern und Alkohollösungen ausgelöst werden. Bei Verwendung solcher Kombinationen ist eine Vermischung oder direkter Kontakt durch Zwischenspülen mit Niedrigsalzpuffer oder Wasser zu vermeiden.
7. Behandeln Sie alle Teile der Anlage entsprechend vorsichtig und vermeiden Sie das Eindringen von Luft und Schmutz. Besonders empfindlich reagieren Gelfiltrationssäulen, diese sind dazu auch noch besonders teuer. Bitte lassen Sie im Umgang mit diesen Säulen besondere Sorgfalt walten und vermeiden Sie das Eindringen auch kleinster Luftmengen. Diese können die Packung beschädigen. Passen Sie insbesondere auch auf, dass in Flaschen oder beim Laden von Proben der Flüssigkeitsspiegel niemals soweit fällt, dass die Pumpe Luft ansaugt!

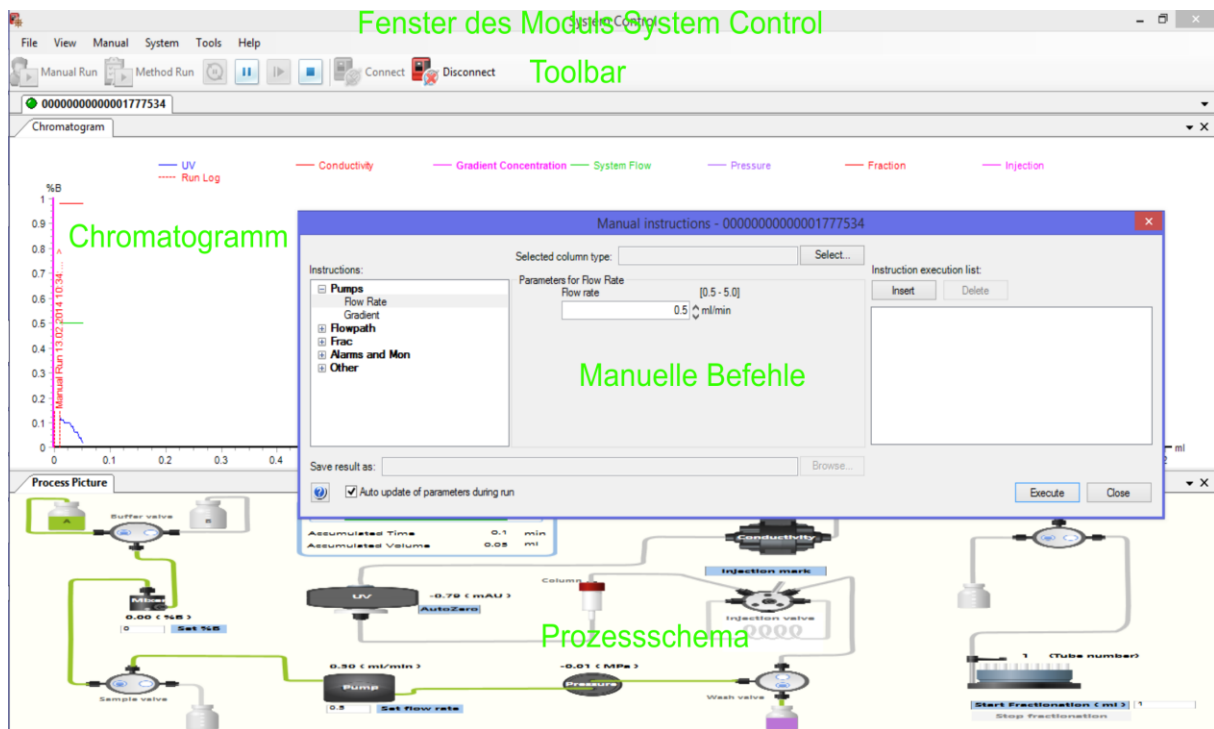


Abb. 2: Das Modul ‚System Control‘ von Unicorn start

### Erste Schritte auf dem FPLC-System

Zu jedem FPLC-System gehört ein Steuerrechner, auf diesem läuft die Steuersoftware „Unicorn“. Sofern notwendig, ist diese durch einen (Doppel-) Klick zu starten. Die Softwaresuite besteht aus den vier Applikationen Administration, System Control, Method Editor und Evaluation. In einem Dialogfeld werden Sie beim Start des Programms gefragt, welche Applikationen Sie starten möchten. Wählen Sie hier bitte alle vier aus. Wir werden uns zunächst mit der Applikation System Control beschäftigen (Abb. 2). Bringen Sie das zugehörige Fenster in den Vordergrund und aktivieren Sie es durch einen Mausklick. Unterhalb der Menüzeile befindet sich der Toolbar mit der Schaltfläche „Connect“. Drücken Sie diese, die Software wird daraufhin die Verbindung zu Ihrer FPLC-Maschine herstellen. Sollte hier eine Fehlermeldung auftauchen, kontaktieren Sie bitte Ihren Betreuer.

Im unteren Fensterdrittel finden Sie das ‚Prozessschema oder Process Picture‘. Dies zeigt Ihnen alle Elemente Ihres FPLC-Systems. Studieren Sie dies bitte eingehend und lokalisieren Sie alle dargestellten Ventile und sonstigen Elemente an der Maschine. Nehmen Sie ggf. dazu Abb. 1 oder das Maschinenhandbuch zur Hilfe.

Wenn Sie sich soweit mit dem Aufbau der Maschine zurechtgefunden haben, bereiten wir diese für den ersten Lauf vor. Dafür benötigen wir folgende Lösungen:

1l MilliQ-Wasser in einer 1l-Flasche und

100 ml 1% Azeton in Wasser

Bitte erinnern Sie sich an die Grundregel, dass alle Lösungen für die Verwendung an der FPLC-Maschine zuerst zu filtrieren sind.

1. Nun tauchen wir beide Einlässe, A und B des Pufferventils in die Wasserflasche ein.
2. An die Verbindungen 2 und 5 des Injektionsventils (Nr. 7 in Abb. 1 oben) schließen wir die 1ml-Probenschleife („sample loop“) an. Die Handhabung der „Fingertight“-Verschraubungen wurde Ihnen bereits demonstriert. Bei Schwierigkeiten oder Unklarheiten fragen Sie bitte unbedingt nach, bevor Sie Verschraubungen vornehmen.
3. Ausgang 1 des Injektionsventils wird mittels einer kurzen, roten (ggf. auch grünen Leitung) mit dem Eingang (an der Unterseite) der UV-Messzelle Verbunden. Protokollieren Sie die exakte Länge und den Typ (rot oder grün) der Verbindungsleitung.
4. Die Stellung des Injektionsventils muss „Load Sample“ sein, legen Sie den Betätigungshebel ggf. um.
5. Protokollieren Sie die Wasser- und Raumtemperatur.
6. Befüllen Sie eine 5 ml-Spritze mit 1%iger Azetonlösung, entfernen Sie sorgfältig alle Luft und verbinden Sie die Spritze mit dem Luer-Verschluss 3 auf der Stirnseite des Injektionsventils.
7. Injizieren Sie 2,5 ml und belassen Sie die Spritze am Ventil.
8. Wir starten nun die Systempumpe. Sollte der Verschlusshebel des Pumpenkopfes entspannt sein, schließen Sie diesen bitte und prüfen Sie den korrekten Sitz des Pumpenschlauchs. Gehen Sie zum Fenster „System Control“ und aktivieren Sie dieses. Mit der Tastenkombination Strg+M holen wir das Fenster „Manual Instructions“ hervor. In der Box „Instructions“ doppelklicken Sie bitte auf „Pumps“, es erscheinen nun weitere Unterpunkte, markieren Sie das Kommando „Flow Rate“. In der Fenstermitte erscheint ein Eingabefeld für den zugehörigen Parameter „Flow Rate“ in ml/min. Setzen Sie diesen auf 1 ml/min. Lösen Sie den Befehl zum Pumpenstart durch einen Klick auf die Schaltfläche „Execute“ aus. Im Reiter „Chromatogram“ des Fensters „System Control“ sehen Sie nun ein Diagramm verschiedener Parameter, die kontinuierlich fortgeschrieben werden. Machen Sie sich damit vertraut. Sie können hier beliebig zoomen. Ein Rechtsklick auf diesen Reiter lässt ein Kontextmenü erscheinen. Hier finden Sie den Punkt „Reset Zoom“, der Sie wieder in die Gesamtansicht bringt. Ein Klick auf die X-Achse lässt Sie zwischen Zeit- und Volumenansicht wechseln. Setzen Sie jetzt die X-Achse auf Volumenanzeige (ml) und den Zoom auf Gesamtansicht. Wählen Sie im Kontextmenü den letzten Punkt „Customize“ an. Setzen Sie im nun erscheinenden Fenster den „Axis Scale“ von „Auto“ auf „Window“ mit der Größe 10 ml.
9. Beachten Sie, dass die angesaugte Flüssigkeit bisher die Maschine über die Leitung W1 am Waschventil verlässt (Tropfen in der Abfallflasche!). Wir werden das nun ändern. Das aktuelle Fließschema finden Sie grün markiert im Reiter „Process Picture“. Schauen Sie sich dieses genau an. Mit dem Kommando „Wash Valve“ im Bereich „Flowpath“ setzen wir das Waschventil nun von „Waste“ auf „Column“. Vergessen Sie nicht, die Kommandoausführung generell durch einen Klick auf die „Execute“-Schaltfläche auszulösen. Beachten Sie die Änderungen im Prozessschema und dass die Flüssigkeit die Maschine nun über den Ausgang W3 am Ausgangsventil verlässt. Die Flüssigkeit durchströmt dadurch nun auch die UV- und Leitfähigkeitsmesszelle.
10. Wir injizieren über das Injektionsventil 100ul Azetonlösung in den Flüssigkeitsstrom. Dazu legen Sie den Ventilhebel für 6 Sekunden (Stoppuhr!) auf „Inject to column“ um und setzen im gleichen Moment per Befehl „Injection Mark“ eine Markierung. Nach Ablauf der 6 Sekunden legen Sie den Hebel sofort wieder zurück auf die Position „Load sample“. Beobachten Sie den Verlauf des Chromatogramms und warten Sie etwa 2min.

11. Im Toolbar befindet sich ein Stoppknopf (Quadratsymbol), mit dem sich der aktuelle Lauf beenden lässt. Drücken Sie diesen jetzt. Die Daten des aktuellen Laufs werden nun gespeichert.
12. Gehen Sie zum Fenster ‚Evaluation‘ und laden Sie über File->Open->Open Result aus dem Ordner ‚xxxxxxxx (Manual)‘ den datumsmäßig letzten Eintrag. Ihr Chromatogramm sollte nun erscheinen. Machen Sie sich mit den Möglichkeiten des Auswertungsmoduls vertraut. Nehmen Sie sich dazu auch die Hilfedatei oder das Handbuch (CD oder online) zur Hilfe. Welche Form hat der erzeugte Puls? Vermessen Sie diesen nach den üblichen Kriterien. Speichern Sie schließlich Ihre Datei in einem neu angelegt Ordner (Gruppenname und Praktikumstag) unter einem aussagekräftigen Namen mittels File->Save as.

Mit den neuerworbenen Kenntnissen starten Sie nun Ihren ersten

### **Versuch: Einfluss von Leitungslänge, Probenviskosität, Flußgeschwindigkeit und Pulsbreite**

Sie verwenden im Folgenden weiter Wasser als Flussmittel. Neben der bereits hergestellten 1%-igen Azetonlösung benötigen Sie nun noch

100 ml einer Lösung von 1% Azeton und 60% Glycerin in Wasser

Setzen Sie nun die Flußrate auf 0,5 ml pro Minute. Damit wird ein neuer Lauf gestartet. Beachten Sie, dass nun alle automatisch geschalteten Ventile wieder in Ausgangsstellung sind. Schalten Sie deshalb das Waschventil zurück in Stellung ‚Column‘. Wir werden nun eine Reihe Azetonpulse unter verschiedenen Betriebsbedingungen testen. Füllen Sie zunächst wieder die Probenschleife komplett mit 1%iger Azetonlösung. Erzeugen Sie wie oben beschrieben einen Puls von 100 ul. Beachten Sie, dass das Injektionsventil nun 12 Sekunden geschaltet werden muss, da wir die Flussrate halbiert haben! Wiederholen Sie dies nun bei einer Flussrate von 5 ml/min. Hier ist Schnelligkeit bei der Bedienung des Injektionsventils gefragt (1,2 Sekunden Injektionsdauer)! Nun erhöhen Sie die Pulsbreite auf 1000ul und führen den Test ebenso bei 0,5 und 5,0 ml/min Flussrate durch. Vergessen Sie nicht, immer wieder die Injektionsschleife nachzufüllen!

Im nächsten Durchgang verwenden wir die Azeton-Glycerinlösung zur Füllung der Injektionsschleife. Spülen Sie diese dazu zunächst mit mindestens 3ml dieser Lösung. Nun führen wir alle vier Pulsvarianten mit diesem hochviskosen Tracer durch.

Schließlich montieren wir eine 5ml-Probenschleife zwischen Anschluss 1 des Injektionsventils und der UV-Messzelle zur Simulation einer langen Leitung. Lassen Sie sich dabei ggf. von einem Betreuer helfen. Nun werden alle acht obigen Pulsvarianten wie beschrieben wiederholt.

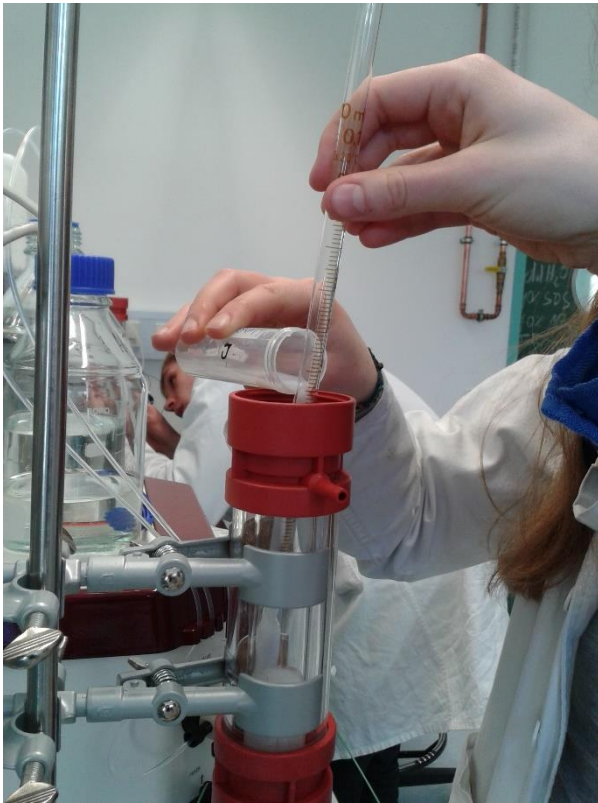
Schauen Sie sich die erzeugten Pulse genau an. Welche Form haben sie? Vermessen Sie ihre Breite, ggf. als Sigma-Wert. Diskutieren Sie anhand der Ergebnisse den Einfluss von Leitungslänge (Verzögerungsvolumen), Viskosität, Flussrate und Pulsbreite auf die Signalform und Pulsschärfe.

Welche Erkenntnisse lassen sich aus diesen Ergebnissen für die optimale Nutzung von FPLC-Maschinen ableiten?

## **Tag 2 bis 4**



## Packen von Säulen und Leistungstests

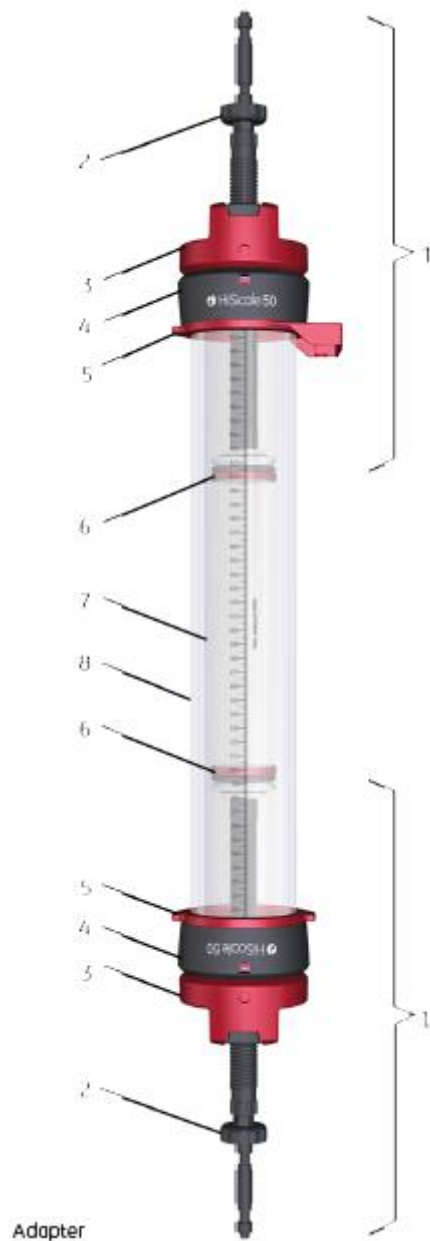


Sie haben am Vortag bereits gelernt, das Auflösungsverhalten Ihrer Maschine zu charakterisieren. Wir werden nun chromatografische Säulen packen und die Qualität der Packung mit einem ähnlichen Azetontest validieren. Wie bereits eingangs erwähnt, stehen uns im Rahmen des Praktikums verschiedene Chromatografiematerialien der Firma GE zur Verfügung. Das gängigste Material ist für unseren Anwendungszweck chemisch quervernetzte Agarose. Entsprechendes Material dieses Herstellers wird als ‚Sephacose‘ vertrieben und uns stehen hier die zwei Größenvarianten: Fast Flow (FF, durchschnittliche Partikelgröße 90  $\mu\text{m}$ ) für hohe Flussraten und High Performance (HP, durchschnittliche Partikelgröße 34  $\mu\text{m}$ ) für hohe Auflösung zur Verfügung. Generell ist die Handhabung der FF-Sephacose etwas weniger anspruchsvoll. Gepackte FF-Sephacose-Säulen sind im Gebrauch robuster und neigen insbesondere bei Verwendung von Rohlysaten weniger zur Ver-

stopfung. Wir werden deshalb zunächst **Q-Sephacose FF** für unsere Packungsexperimente verwenden. Als Säulenmantel verwenden wir die an Ihrem Arbeitsplatz befindliche HiScale 16-Säule (16 mm Innendurchmesser). Ihr Aufbau ist in Abb. 3 dargestellt. Später werden wir auch die dickere XK 26-Säule (26 mm Innendurchmesser) verwenden.

Bitte warten Sie zunächst jedoch noch ab, die Handhabung der Säule wird Ihnen im Detail demonstriert werden und ein Betreuer wird Sie soweit einweisen, dass Sie die gesamte Säule schließlich zerlegen und wieder zusammensetzen können. Bitte passen Sie bei jedem Zerlegen der Säule sorgfältig auf, dass Sie keine Kleinteile verlieren.

**Abb. 3: Aufbau einer HiScale-Säule: 1-Adapter, 2-Endknopf, 3-Endkappe, 4-Abschlussgehäuse, 5-Tubushalterung, 6-Stempel mit aufsitzendem Materialsieb und O-Ring, 7 innere Säule aus Borosilikatglas, 8 Säulenmantel aus Polycarbonat**



### Packen einer HiScale 16 Q-Sepharose FF-Säule mit 18ml Bettvolumen

Benötigte Reagenzien: Q-Sepharose als 50%ige Aufschwemmung in 20% Ethanol; 1l 1% Ethanol, filtriert als Packflüssigkeit. Sonstiges: Spritze 10ml, Tubing, Schraubverbinder Luer-Lock auf Fingertight, evtl. weitere Adaptern.

1. Üblicherweise wird Chromatografiematerial als eine ca. 50%ige Suspension in 20% Ethanol aufgehoben. Aufgeschwemmtes Material sedimentiert recht zügig, wenn es steht. Schütteln

Sie die Vorratsflasche deshalb vor jeder Entnahme energisch auf, bis alles Material mobilisiert ist. Um eine Säule mit 18ml Bettvolumen zu packen, benötigen wir in etwa das 2,5fache Volumen an Vorratssuspension. Füllen Sie also etwa 45 ml der Q-Sepharose FF-Suspension in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen mit konischem Boden. Zentrifugieren Sie dieses für 2 Minuten bei 2000 U/min und entnehmen Sie es dann vorsichtig ohne Aufwirbelungen zu verursachen aus der Zentrifuge. Lesen Sie an der Gradation das Volumen des sedimentierten Materials ab. Entnehmen Sie dann vorsichtig den Überstand mit einer Pipette. Berechnen Sie das benötigte Volumen an Packflüssigkeit, um eine 70%ige Aufschwemmung des Mediums herzustellen und geben Sie es auf das Material.

- Spannen Sie Ihre HiScale-Säule neben der FPLC-Maschine in Ihr Stativ. Achten Sie auf gute Zugänglichkeit und platzieren Sie ein Becherglas unter der Säule.
- Entnehmen Sie die Säule wieder dem Stativ. Lockern Sie die Stempeldichtung durch Lösen des Endknopfgewindes. Entnehmen Sie beide Stempel Ihrer Säule durch Abschrauben des Endgehäuses. Dabei nicht am Säulenmantel, sondern an der Tubushalterung gegenhalten! Prüfen Sie den festen Sitz beider Stempel am Gewinde sowie den korrekten Sitz der Materialsiebe. Achtung: unter dem Materialsieb liegt nochmals ein grobes Netz, dieses nicht verlieren!
- Füllen Sie die Spritze blasenfrei mit Packflüssigkeit und verbinden Sie diese über Tubing mit dem unteren Stempel. Drücken Sie solange Packmedium durch den Stempel, bis alle Luft aus dem Stempelinneren entwichen ist.
- Schließen Sie die Packflüssigkeit an der Maschine an und spülen Sie diese. Schalten Sie die Maschine auf Pause und dann das Waschventil in Stellung ‚Column‘.
- Montieren Sie den unteren Stempel wieder in der Säule auf 0ml-Position und ziehen sie den Dichtungsring durch Drehen des Endknopfs an. Drücken Sie weitere etwa 1 ml Packflüssigkeit in die Säule, nehmen Sie die Spritze ab und verschließen sie den unteren Säulenausgang. Schließen Sie die neu befüllte Spritze am oberen Stempel an und spülen sie diesen genauso wie den unteren. Bringen Sie den oberen Stempel in eine Position, die etwa 90% Auszug entspricht.
- Spannen Sie die Säule wieder in das Stativ und richten Sie sie mit Wasserwaage exakt senkrecht aus.
- Geben Sie 30 ml der nach (1) hergestellten 70%igen Aufschwemmung des Sepharosematerials (frisch aufgeschüttelt, aber möglichst schaumfrei) blasenfrei in die Säule. Dies geschieht am besten durch Herabgießen an einem Glasstab oder einer Glaspipette.
- Überschichten Sie nun auf gleiche Weise die Materialaufschwemmung mit Packflüssigkeit bis zum oberen Rand der Säule
- Geben Sie tropfenweise weiter Packflüssigkeit zu, bis sich ein Meniskus bildet. Nehmen Sie den oberen Stempel zur Hand und pressen Sie noch etwas Flüssigkeit aus der angeschlossenen Spritze nach. Montieren Sie den oberen Stempel blasenfrei, dabei läuft Packflüssigkeit über und in tropft in das unter der Säule platzierte Becherglas. Ziehen sie die O-Ring-Dichtung leicht an und entfernen Sie die Spritze. Drehen sie den oberen Stempel durch Drehen der Endkappe etwas hinein, dabei wird alle eventuell noch vorhandene Luft aus dem oberen Stempel sowie dem zugehörigen Tubing verdrängt.
- Schalten Sie die Pumpe der Maschine auf 0,5 ml/min und starten Sie diese. Führen Sie eine Tropfen-Tropfen-Verbindung vom Ausgang 1 des Injektionsventils zum Säuleneingang aus, schrauben Sie die Verbindung aber noch nicht dicht, sonst baut sich Überdruck auf!

12. Öffnen Sie den Säulenausgang, so dass austretende Flüssigkeit ins Becherglas tropft. Jetzt ziehen Sie die Verbindung am Säuleneingang an, bis sie dicht ist. Ziehen Sie die O-Ring-Dichtung des oberen Stempels fest an.
13. Schalten Sie die Pumpe auf 5 ml/min. Das Material sedimentiert nun unter Fluß. Warten Sie, bis alle Kügelchen sedimentiert sind und sich eine klar erkennbare Oberfläche ausgebildet hat. Lassen Sie die Pumpe nun weitere 20 Minuten Laufen.
14. Markieren Sie die Betthöhe mit einem Stift an der Säule.
15. Stellen Sie die Pumpe ab, schließen Sie den unteren Säulenausgang, öffnen Sie die Verbindung Säuleneingang-Maschine und drehen Sie den oberen Stempel herunter, bis er exakt das Bett berührt. Lockern Sie dazu ggf. leicht die Stempeldichtung durch drehen am oberen Endknopf. Schließen Sie die Säule luftfrei wieder an der Maschine an, öffnen Sie den Säulenausgang wieder und ziehen Sie ggf. die Stempeldichtung wieder fest.
16. Lassen sie die Pumpe weitere 5 Minuten bei 5ml/min laufen.
17. Öffnen Sie den Säuleneingang erneut wie unter 15 beschrieben und drehen Sie den Stempel 1-2 mm weiter als die angebrachte Markierung in die Säule hinein.
18. Verschließen Sie die Säule unten und oben und bringen Sie einen Aufkleber mit Materialtyp und Bettvolumen an.

Herzlichen Glückwunsch – Sie haben Ihre erste Säule gepackt!

Wir werden nun die Qualität der Packung messen. Dazu führen wir einen

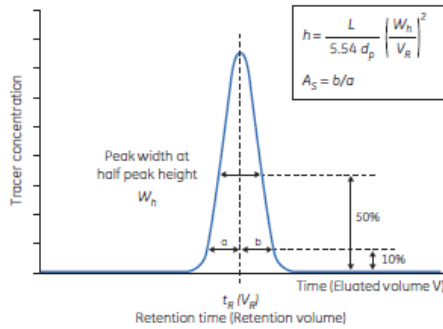
#### **Test der Pulsantwort der Säule („Azetontest“) durch.**

Sie haben am ersten Tag bereits die Pulsantwort des Systems selbst charakterisiert. Wir werden nun dieses Verfahren an Ihrer Säule anwenden. Wie Sie bereits gesehen haben, nähert sich die Antwort eines realen Systems auf einen kurzen Puls einer Gausskurve („Peak“) an. Die Breite des Peaks und seine Asymmetrie sind wichtige und nützliche Parameter zur Charakterisierung eines Systems und letztlich zur Bewertung der Leistungsfähigkeit Ihres Equipments.

Wir benötigen wieder (sorgfältig und frisch entgastes/gefiltertes!) Wasser als Laufmedium und eine 1%ige Azetonlösung als Tracer.

1. Montieren Sie die Säule an der vorgesehenen Stelle ins System. Montieren Sie eine 2ml oder 5ml Probenschleife.
2. Spülen Sie sie Probenschleife. Äquilibrieren Sie die Säule mit Wasser. Spülen Sie zumindest kurzzeitig auch auf voller Pumpenleistung, um eventuell gefangene Luft mitzureissen.
3. Spülen Sie die Probenschleife mit dem 2,5fachen Schleifenvolumen 1% Azeton.
4. Setzen Sie die Flussrate auf 0,7 ml/min. Bei einer Säule mit 16mm Durchmesser ergeben sich daraus 20 cm/h Laufgeschwindigkeit, gemäß Herstellerangaben liegt hier das Optimum für FF-Sepharose.
5. Setzen Sie eine Injektionsmarke und injizieren Sie gleichzeitig 1% des Bettvolumens der Säule, also 0,15 ml (Stoppuhr!) Tracer in die Säule.

6. Warten Sie die Pulsantwort ab, stoppen Sie dann den Lauf und laden Sie das Ergebnis ins Auswertungsmodul. Speichern Sie es unter einem aussagekräftigen Namen in einem eigenen Ordner.



**Abb. 3: Bestimmung der Zahl der theoretischen Böden  $N$ , Der Höhe eines theoretischen Bodens HETP, der reduzierten Höhe eines theoretischen Bodens  $h$  und des Asymmetriefaktors  $A_s$  aus den Maßen  $V_R$ ,  $t_R(V_R)$ ,  $W_h$  sowie  $a$  und  $b$  der Pulsantwort**

The relative peak width is defined as number of (theoretical) plates ( $N$ ), height equivalent of a theoretical plate (HETP) or preferably as reduced plate height ( $h$ ):

$$N = \frac{\mu_1^2}{\sigma^2} \approx 5.54 \left( \frac{V_R}{W_h} \right)^2$$

$$HETP = \frac{L}{N}$$

$$h = \frac{HETP}{d_p} = \frac{L}{d_p} \frac{\sigma^2}{\mu_1^2} = \frac{L}{d_p} \frac{1}{5.54} \left( \frac{W_h}{V_R} \right)^2$$

The asymmetry factor  $A_s$  describes the deviation from an ideal Gaussian peak shape and is calculated from the peak width at 10% of peak height:

$$A_s = b/a$$

**Definitions**

Plate number	$N$
Mean residence time *	$\mu_1$
Variance*	$\sigma^2$
Retention time **	$t_R$
Retention volume**	$V_R$
Peak width at half peak height	$W_h$
Bed height	$L$
Particle diameter	$d_p$
Height equivalent of a theoretical plate	HETP
Reduced plate height	$h = HETP/d_p$
Asymmetry factor	$A_s$

Vermessen Sie nun die Pulsantwort gemäß Abb. 3 durch die Größen  $V_R$ ,  $t_R(V_R)$ ,  $W_h$  sowie  $a$  und  $b$

und bestimmen Sie aus diesen Werten sowie der Betthöhe  $L$  und dem Partikeldurchmesser  $d_p$  die Zahl der theoretischen Böden  $N$ , die Höhe eines theoretischen Bodens HETP, die reduzierte Höhe eines theoretischen Bodens  $h$  und den Asymmetriefaktor  $A_s$ .

Führen Sie den Test auch bei Flussraten von 0.5, 2, 3, 4 und 5 ml/min aus und tragen Sie in einem Diagramm  $h$  und  $A_s$  gegen die Laufgeschwindigkeit auf. Wo liegt das Optimum bezüglich reduzierter Bodenhöhe und Asymmetrie? Gute Werte für  $h$  liegen im Bereich von 1,5-3, Für poröse Materialien liegt das theoretische Optimum bei 1,5-2,0. Der akzeptable Bereich für  $A_s$  liegt zwischen 0,8 und 1,8. Beachten Sie in diesem Zusammenhang, dass aufgrund der Peakverbreiterung schlechter auflösende Säulen an sich zu numerisch besseren Asymmetriefaktoren tendieren!

Packen Sie nun auch eine 18 ml-Säule mit 26 mm Durchmesser, benutzen Sie dazu Ihre XK 26-Leersäule. Testen Sie diese bei 20 cm/h Laufgeschwindigkeit (die Laufgeschwindigkeit ist der Volumenstrom dividiert durch die Querschnittsfläche der Säule). Vergleichen Sie die Werte für  $h$ ,  $N$  und  $A_s$  der kurzen, dicken und der langen, dünnen Säule!

Markieren Sie die momentane Höhe des Säulenbetts Ihrer HiScale 16-Säule. Entnehmen Sie Ihrer HiScale 16-Säule nun das Material, indem Sie die Säule oben öffnen, etwa ein halbes Bettvolumen Wasser zugeben und mit etwas Luft den Stempel wieder verschließen. Durch kräftiges Schütteln wird nun das Material wieder mobilisiert und herausgegossen. Ggf. wiederholen Sie den Vorgang, bis alles Material mobilisiert ist. Vergleichen Sie die aktuelle Betthöhe mit der vorher angebrachten Markierung, notieren Sie die Differenz. Testen Sie die Säule erneut. Was stellen Sie bezüglich Auflösung, Peakform und Asymmetriefaktor fest?

Packen Sie nun nach Belieben Ihre Säulen nach den Regeln der Kunst neu und dokumentieren Sie ihre Leistungsfähigkeit mit dem Pulstest, bis Sie mit ihrer Leistungsfähigkeit zufrieden sind. Sobald das der Fall ist, erhalten Sie Q-Sepharose HP-Material, das eine höhere Auflösung ermöglicht. Packen Sie nun eine HiScale 16 Q-Sepharose HP-Säule mit 18 ml Bettvolumen und vergleichen Sie ihr Auflösungsvermögen sowie den erzeugten Rückdruck mit der zuvor gepackten entsprechenden Q-Sepharose FF-Säule.

Sofern die Zeit es zulässt, können Sie auch noch die Auswirkungen möglicher Fehlerquellen exemplarisch testen: Eine Neigung der Säule beim Packen von ca. 15° sowie das Packen des Betts in zwei getrennten Durchgängen.

**Achten Sie darauf, dass verschiedenen Materialien sich nicht mischen! Leersäulen sind peinlich von allen Resten anhaftenden Materials zu befreien. Alle Gefäße und Säulen sind genau mit dem Materialtyp zu beschriften, z. B. „Q-Sepharose FF“.**

Weitere Informationen finden Sie unter anderem in der GE Healthcare Application note **28-9372-07 AA**.

## Tag 5

Wir werden nun eine erste

### Trennung eines Proteingemisches mittels Ionentauschersäule

durchführen. Sie erhalten ein Gemisch aus drei farbigen Proteinen: Hämoglobin, Ferritin und ein Fusionsprotein aus SUMO und GFP.

Material und Reagenzien:

6 ml Hiscale Q-Sepharose HP-Säule (selbstgepackt) und Sephacryl 300 HR-Säule

1l Puffer IEX-A: 25 mM Tris pH 7,5

1l Puffer IEX-B: 25 mM Tris pH 7,5; 1 M NaCl

12%ige SDS-Gele, Coomassie-Färbelösung und Entfärber, Probenpuffer

Das Proteingemisch erhalten Sie von Ihrem Betreuer.

Machen Sie sich durch ein paar Testläufe mit der Handhabung des Probensammlers vertraut. Laden Sie diesen dann mit 15 ml Greiner-Röhrchen (ohne Deckel).

1. Packen Sie zunächst die 6 ml Hiscale 16 Q-Sepharose HP-Säule. Beachten Sie, dass beim Packen einer Säule mit geringer Betthöhe der untere Stempel nicht bei 0 sondern bei 5cm positioniert sein sollte. Setzen Sie das Drucklimit dem Material entsprechend (3bar). Schließen Sie Puffer IEX-A und IEX-B an die Eingänge A und B der Maschine an und spülen sie die Eingänge.
2. Geben Sie zunächst 2 Säulenvolumen IEX-B über die Säule und dann solange IEX-A, bis die Leitfähigkeitsmessung stabil ist.
3. Nehmen Sie 200 ul Proteinprobe in 1ml Puffer IEX-A auf und zentrifugieren Sie bei 4°C für mindestens 20 Minuten. Nehmen Sie für Gele und Proteintests 60 ul ab und stellen Sie diese beiseite.
4. Montieren Sie eine 2ml (oder größer) Probenschleife an der Maschine und spülen Sie diese mit Puffer IEX-A. Injizieren Sie die Probe in den loop.
5. Schalten Sie für die Bindung die Flußrate auf 0,5 ml/min und injizieren Sie die Probe aus der Schleife auf die Säule. Fangen Sie den Durchlauf in 1-3 Portionen im Probensammler auf.
6. Stoppen Sie den Probensammler und schalten Sie die Flußrate soweit herauf, wie es die Druckstabilität (3 bar) des Materials erlaubt. Waschen Sie solange, bis keine nennenswerten Mengen an Protein mehr von der Säule kommen, in der Regel sind dies zwischen 5 und 20 Säulenvolumen.
7. Schalten Sie die Flussrate auf 1,5 ml/min zurück. Eluieren Sie mit einem 15 Säulenvolumen (CV) langen Gradienten auf 100% B und sammeln Sie dabei 1,6 ml-Fraktionen. Beobachten und protokollieren Sie anhand der Färbung der Proteine das Verhalten bei der Elution. Gibt es Zonen, wenn ja, wandern diese? Ist die Elution eher diffus? Etc. ...

Stoppen Sie den Lauf dann und sichern Sie die Proben für weitere Verarbeitung.

Bestimmen Sie mit dem Bradford-Assay die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen und der ursprünglichen Probe. Tragen Sie jeweils 8ul der einzelnen Fraktionen auf ein SDS-Gel auf.

Wie hoch ist die Rückgewinnung des Gesamtproteins in Prozent (Vergleich Proteinmenge der aufgetragenen Probe gegen Gesamtproteinmenge des Durchlaufs und aller Fraktionen)? Bei welchen Leitfähigkeiten eluieren die verschiedenen Proteine? Wie ist die Separation der einzelnen Peaks in den beiden Läufen sowie die Reinheit der einzelnen Fraktionen? Recherchieren oder ermitteln sie die nativen / denaturierten Molekulargewichte der einzelnen Proteine sowie ihre (theoretischen) isoelektrischen Punkte. Entspricht die Reihenfolge der Elution den theoretischen Erwartungen?

## Tag 6

### Größenausschlusschromatografie, ‚Gelfiltration‘

Wir benötigen die Sephacryl S-300-Gelfiltrationssäule sowie 1l Puffer GF: 25 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl.

Bei der Arbeit mit Gelfiltrationssäulen ist besonders auf Luftfreiheit und Sauberkeit von Puffern und Proben zu achten. Halten Sie unbedingt das Drucklimit von 1,5 bar ein! Die Vorgehensweise für den Gelfiltrationslauf ist wie folgt:

1. Schließen Sie die Sephacryl-Säule und eine 1ml Probenschleife an die Maschine an und richten Sie diese mittels Wasserwaage exakt senkrecht aus. Achtung: Sephacryl-Material hat einen recht niedrigen zulässigen Maximaldruck von 1,5 bar. Setzen Sie das Drucklimit der Maschine entsprechend. Die zu erwartenden möglichen Flußraten liegen bei 1ml/min oder darunter.
2. Äquilibrieren Sie die Säule mit ca. 2 CV Puffer GF bis Leitfähigkeit und UV stabil erscheinen. Dies kann 1-2 Stunden in Anspruch nehmen.
3. Füllen Sie 250ul Proteinmix mit Puffer GF auf 0,5ml auf und zentrifugieren Sie dann für mindestens 30 min.
4. Schalten Sie die Flußrate auf 0,5 ml/min.
5. Injizieren Sie die Probe über die Probenschleife auf die Säule.
6. Schalten Sie kurz vor Erreichen des Ausschlussvolumens (zu bestimmen mittels Dextranblau) den Probensammler an und sammeln Sie 600 ul-Fractionen in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen.

Beobachten Sie wieder das Verhalten der Proteine auf der Säule. Berücksichtigen Sie, dass bei einer Gelfiltration die Probe nicht an die Säule bindet, sondern in einem einheitlichen Puffersystem kontinuierlich eluiert wird (isokratische Elution). Beobachten Sie auch die Gleichmäßigkeit des Probenauftrags. Sammeln Sie die eluierten Proteine fraktioniert auf und tragen Sie von jeder Fraktion 8ul auf ein SDS-Gel auf. Tragen Sie in einem Diagramm das Molekulargewicht der Eichproteine gegen das Elutionsvolumen halblogarithmisch auf (Molekulargewicht auf der log-Achse). Bestimmen Sie anhand der Eichgerade das apparente Molekulargewicht von Ferritin, Hämoglobin und des SUMO-GFP-Fusionsproteins.



## Tag 7

### Reinigung von bakteriell exprimiertem SUMO-GFP

Sie haben sich mittlerweile intensiv mit den technischen Grundlagen moderner Säulenchromatografie befasst. Es ist nun Zeit, eine ‚echte‘ Problemstellung zu bearbeiten: Die Reinigung eines in E. coli über-exprimierten Fusionsproteins zwischen SUMO und GFP. In der Regel unterscheidet man drei Phasen eines klassischen Proteinreinigungsprotokolls: Capture, Intermediate und Polishing. In der (heute durchzuführenden) Capture-Phase versucht man, das Protein effektiv an eine Säule zu binden und so ggf. auch aus einem großen Anfangsvolumen aufzukonzentrieren. Eine Vielzahl –auch großpartikelige und Nichtprotein- Verunreinigungen können nun fortgewaschen werden. Hier ist eine kurze, dicke Sepharose FF-Säule die richtige Wahl.

### Zellaufschluss und Zentrifugation

Jede Gruppe erhält etwa 20 ml Zellsuspension in einem 50ml Greiner-Röhchen. Da die Zellsuspension Proteasen enthält, welche vor allem beim Zellaufschluss freigesetzt und aktiviert werden, geben wir den Proteaseinhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) hinzu. Dieser inhibiert Serin-Proteasen durch irreversible Bindung des katalytisch aktiven Serins im aktiven Zentrum. Darüber hinaus werden wir während der gesamten Reinigung das native **Proteinmaterial auf Eis** handhaben, um die Restproteaseaktivität auf ein Minimum zu reduzieren. Geben Sie also 0,2mM PMSF (mittels ausgeteilter 0,2M Stammlösung) zu Ihrer Zellsuspension. Die Zellen werden nun per Ultraschall-Sonifikation aufgeschlossen. Das Lysat wird dann für 30 Minuten bei 40,000 U/min in der Ultrazentrifuge geklärt. Schliessen Sie nun Ihre zuvor gepackte 18 ml XK 26 Q-Sepharose FF- an die Maschine an.

### Capture: IEX



Puffer: IEX-A und IEX-B (s.o.)

Tragen Sie das geklärte Lysat bei 0,5 ml/min über das **Probenventil** auf. Passen Sie gut auf, dass Sie keine Luft ansaugen und Spülen Sie mit etwas Puffer nach. Waschen Sie die Säule mit Puffer IEX-A, fahren Sie einen Gradienten auf 100%B mit 15 CV und sammeln Sie dabei 5 ml-Fractionen. Tragen Sie davon jeweils 8ul-Proben auf ein 12%iges SDS-Gel auf (sie erhalten gereinigtes SUMO-GFP als Marker!) und entscheiden Sie anhand des Gels und der Stärke der Grünfärbung, welche Fractionen Sie weiterverwerten und poolen wollen. Es gilt hier in der Regel, einen Kompromiss zwischen Ausbeute und Reinheit zu finden.

## Tag 8

### Intermediate: HIC und HIC-Scouting

Puffer: HIC-A: 25mM Tris pH 7,5; 1,5M Ammoniumsulfat; HIC-B 15mM Tris pH 7,5

Bei Hydrophober Interaktions-Chromatografie (HIC) kommt es mehr als bei IEX auf die Wahl des Materials an. Beachten Sie dass „schwache“ Ionentauscher keineswegs per se schwächer mit Proteinen

interagieren als „starke“! Bei HIC sieht das jedoch anders aus, die Stärke der Interaktion wird hier wesentlich durch die Natur und Hydrophibizität der Seitenkette bestimmt. Deshalb steht Ihnen ein „HIC Selection –Kit“ zur Ermittlung der geeignetsten Materialchemie zur Verfügung. Für einen HIC-Lauf müssen Sie Ihre Probe zunächst mit 1,5 M Ammoniumsulfat versetzen. Pulverisieren Sie dieses und wiegen Sie es exakt für die Menge Ihres IEX-Pools ein. Geben Sie es unter sanften Rühren spatelweise dazu. Die weitere Vorgehensweise entspricht dann technisch der eines IEX-Laufs. Beachten Sie jedoch, dass Puffer A diesmal der Hochsalzpuffer und Puffer B der Niedrigsalzpuffer ist! Eluieren Sie mit einem 15CV langen Gradienten auf 100% B.

Testen Sie mit Ihrer Phenyl HP-, Butyl HP- und Octyl FF-Säule jeweils ein Zehntel Ihres IEX-Pools und entscheiden Sie anhand von SDS-Gelen, welches die vielversprechendste Säulenchemie ist. Reinigen Sie mit dieser dann Ihren gesamten Pool auf. Beachten Sie aber dabei die begrenzte Bindekapazität der 1ml-Säulen und wiederholen Sie ggf. einen Lauf entsprechend oft. Poolen Sie dann anhand der Bewertung der Reinheit gemäß SDS-Gelanalyse und der Grünfärbung. Ggf. können die Testläufe der Säulen auch auf die einzelnen Gruppen verteilt werden. Sprechen Sie sich ab und tauschen Sie Ihre Ergebnisse aus!

## Tag 9

### Polishing- Gelfiltration

Puffer: GF: 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl

Sie wissen bereits von Tag 6, wie ein Gelfiltrationslauf durchzuführen ist. Wir müssen zunächst den HIC-Pool auf ein Volumen von 500 ul konzentrieren, um die Auflösung des Verfahrens nicht durch zu großes Probenvolumen zu beeinträchtigen. Sie bekommen dafür spezielle Ultrafiltrationseinheiten für Zentrifugen ausgehändigt. Fraktionieren Sie den Lauf mit 500 ul Fraktionsgröße und beurteilen Sie die Reinheit anhand eines SDS-Gels. Poolen Sie nun sehr kritisch, d. h. dass wir gegebenenfalls für eine hohe Homogenität nun auch Abstriche an der Ausbeute in Kauf nehmen. Sofern Sie noch Zeit haben, können wir nun noch einen letzten Schritt mittels einer hochauflösenden 4 ml Q-Sepharose HP-Säule anschließen.

Bestimmen Sie die Proteinkonzentration über die Absorption bei 280 nm, dies ist für gereinigte Proteine eine der exaktesten Bestimmungsmethoden. Die Vorgehensweise wird Ihnen von Ihrem Betreuer erklärt. Konzentrieren Sie das SUMO-GFP auf mindestens 5 g/l, bestimmen Sie schließlich nochmals die exakte Konzentration und frieren Sie die fertige Präparation dann in flüssigem Stickstoff.

## Tag 10

Regeneration aller Materialien und Säulen, Platzabgabe

## Anhang

### Säulen- und Materialregeneration

Die verwendeten Chromatographiematerialien sind chemisch hochbeständig. Material und Säulen erreichen durch regelmäßige rigorose Reinigung sehr hohe Standzeiten. Prinzipiell sind gepackte Säulen in umgekehrter Flussrichtung zu reinigen. Verunreinigungen liegen im Normalfall vorwiegend im oberen Säulenbereich und verlassen durch die Umkehrung die Säule auf kürzestem Weg. Beachten Sie auch hier stets die zulässigen Drucklimits und verwenden Sie nur filtrierte Lösungen!

Wir verwenden folgendes Standardprotokoll:

1. 1 CV Wasser
2. 2CV 1M NaOH (**Schutzbrille ist Pflicht für ALLE im Umkreis der Maschine!**)
3. 1CV Wasser
4. 2 CV 6M Guanidiniumhydrochlorid mit 5 mM DTT
5. 1CV Wasser
6. 2CV 20% Ethanol

Gepackte Säulen mit gespanntem Druckreservoir in 20 % Ethanol lagern. SP-Sepharose in 20% Ethanol mit 0,2M Natriumazetat lagern. Die effektivsten Reinigungsergebnisse erzielt man, indem man das obige Protokoll mit mobilisiertem Material im „Batch“-Verfahren anwendet.

## Rezepte

### SDS-PAGE

<b>10% Trenngel</b>	<b>1 Gel (18,75mL)</b>
Acrylamid [30% (37,5:1)]	6,25
1M Tris-HCl pH 8,8	7,0
ddH <sub>2</sub> O	5,2
10% SDS	95µL
10% APS	95µL
TEMED	95µL
<b>5% Sammelgel</b>	<b>1 Gel (9mL)</b>
Acrylamid [30% (37,5:1)]	1,5mL
1M Tris-HCl pH 6,8	2,25mL
ddH <sub>2</sub> O	5,15mL
10% SDS	45µL
10% APS	45µL
TEMED	22,5µL

### **Bradford-Proteinassay-Lösung (50mL)**

2,5mg Coomassie Blue G250 einwiegen

Lösen sie diesen in 2,5mL Ethanol

Geben Sie vorsichtig 5mL 85% 3-protonige Phosphorsäure (ortho-Phosphorsäure) zu der Farbstoff-Ethanol-Lösung

Geben Sie diese zu 25mL Wasser (NICHT das Wasser zur Säure!!!)

10 Minuten auf dem Magnetrührer rühren

Filtern Sie Ihre Lösung

Geben Sie weitere 17,5mL Wasser hinzu

### **Mix aus drei farbigen Proteinen (wird gestellt):**

1ml Ferritin (Sigma F4503, ca. 50 mg/ml), 1,5ml SUMO-GFP 40 mg/ml, 2ml Hämoglobin (Sigma-Fluka 51290) 50 mg/ml

## **Material**

**6x450 ul Proteinmix**

**6x 20 ml Sumo-GFP-Pellet**

**30 Flaschen 1l**

**15 Flaschen 2l**

**18 Flaschen 500ml**

**12 Racks 15ml Greiner**

**18 große Racks Eppi**

**6 Racks 50 ml Greiner**

**6 Pipettensätze und Spitzen , 6x Arbeitsplatzgrundausrüstung (Spatel, Glaswaren, Mörser etc., Spritzflasche Wasser, 70% EtOH)**

**18 Sätze Gelplatten mit Kämmen und Spacern**

**8 Gelkammern mit Power supply**

**3 Filterkartuschen**

**3 Wasserstrahlpumpen**

**1 Eppi-Kühlzentrifuge**

**2 Photometer UV**

**6 Stoppuhren**

**6 XK-Säulen**

**6 HiScale Säulen**

**SDS-Puffer, Marker, Bradford-Lsg.**

**3l EtOH p. a.**

**PMSF aliquotiert**

**SDS-Laufpuffer 10x, Entfärber, Färber, 5x Sample-P., APS, Temed, Gewebefixativ**

**Beamer**

**Ammoniumsulfat, Tris-Base NaCl, DTT**

**10l-Flasche MiliQ**

**pH-Meter, Waage**

**250 ul Pageruler unstained**

**2 Beutel Eppis 1,5**

**10 Beutel 15 ml Greiner**

**2 Beutel 50 ml Greiner**