

Merksätze Kapitel 37

Trennverfahren und allgemeine Analysemethoden

37.1 Zentrifugation

Zellen, Zellorganellen, Membranvesikel und Makromoleküle können durch Zentrifugation in Medien geringerer Dichte nach ihrer Größe oder in einem Dichtegradienten nach ihrer Dichte voneinander getrennt und isoliert werden. Die analytische Ultrazentrifugation ermöglicht die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten (angegeben in Svedberg-Einheiten S) und der Molekülmasse.

37.2 Chromatographie

Die verschiedenen Chromatographieverfahren trennen Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Verteilung auf eine mobile und eine stationäre Phase:

Chromatographietyp	Moleküleigenschaft	Stationäre Phase	Mobile Phase
Gelfiltration, Ausschluss großer Moleküle aus porösen Gelpartikeln (<i>Size exclusion chromatography SEC</i>)	Molekülgröße und Form	Puffer innerhalb Gelpartikel	Puffer außerhalb Gelpartikel
Ionenaustausch	Ladung	Geladene Gruppen auf inertem Träger	Puffer
Verteilung, z.B. bei Dünnschichtchromatographie mit Cellulose oder Kieselgur (SiO ₂)	Löslichkeit	Wässrig (Hydrathülle der Partikel in Trennschicht)	Apolare organische Lösungsmittel
Affinität	Bindung an spezifische Liganden	Spezifischer Ligand auf inertem Träger	Puffer
Hydrophobe Wechselwirkung (<i>Hydrophobic interaction chromatography HIC</i>)	Bindung an hydrophobe Matrix	Hydrophob	Puffer-Salz-Lösung
<i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography RP-HPLC</i>	Bindung an hydrophobe Matrix	Hydrophob	Laufmittel mit zunehmend apolarem Gradienten
Metallchelate (<i>Immobilized metal ion affinity chromatography IMAC</i>)	Komplexierung (Protein mit His-Tag)	Metall an Matrixchelate	Puffer mit pH 4-5 oder mit Komplexbildner

37.3 Elektrophorese

Elektrophoretische Trennungen von Makromolekülen in Gelen werden heute ihrer hohen Auflösung wegen sehr häufig verwendet. Mit zweidimensionaler Gelelektrophorese, einer Kombination von isoelektrischer Fokussierung (trennt nach *iP*) und *SDS-PAGE* (trennt nach Grösse) können bis zu 2000 verschiedene Proteine voneinander getrennt werden.

37.4 Spektroskopie

Die in der Biochemie gebräuchlichsten spektroskopischen Methoden umfassen die Messung von Absorption, Fluoreszenz und Zirkulardichroismus CD. Spektroskopische Messungen eignen sich zur Bestimmung der Substanzkonzentration, der Aktivität von Enzymen (z.B. optischer Test mit NADH oder NAD⁺), des Konformationszustandes von Makromolekülen, des Bindens von Liganden und der Sekundärstrukturanteile von Proteinen (α - und β -Struktur mit CD). Die Fluoreszenz proteineigener Tryptophanreste, in Proteine eingebrachter Reportergruppen oder besonderer fluoreszierender Proteine (z.B. des *GFP*, mit dem zelluläre Proteine spezifisch markiert werden können) lässt sich mit sehr hoher Empfindlichkeit messen.

37.5 Massenspektrometrie

Die genaue Bestimmung der Molekülmasse mit Massenspektrometrie (*Mass spec*) ermöglicht die schnelle Identifizierung vieler Moleküle, einschließlich der biologischen Makromoleküle und ihrer Fragmente. MS eignet sich auch zur Strukturbestimmung einschliesslich der Bestimmung der Aminosäuresequenz von Peptiden und auch Proteinen sowie zur Analyse komplexer Proteingemische bei der Untersuchung ganzer Proteome.

37.6 Isotopenmarkierung, Radionuclide

Die Markierung eines Biomoleküls mit einem Isotop verändert dessen physikalische und chemische Eigenschaften i.d.R. nur unwesentlich (Ausnahme je nach Fragestellung: Wasserstoffisotope). Aus diesem Grund sowie wegen der empfindlichen und einfachen physikalischen Nachweismethoden eignen sich insbesondere die radioaktiven Isotope hervorragend zur Markierung biologischer Verbindungen im Rahmen vielfältiger Fragestellungen (Aufklärung von Stoffwechselwegen, Bestimmung der Halbwertszeiten biologischer Moleküle oder der Effizienz von Membrantransportvorgängen etc.). Durch sachgemäßen Umgang mit radioaktiv markierten Substanzen kann eine Gefährdung der experimentierenden Personen sowie der Umwelt minimiert werden.

37.7 pH-Puffer

Biochemische Experimente werden in gepufferten Lösungen zumeist im neutralen pH-Bereich durchgeführt. Die Pufferwirkung schwacher Basen/Säuren mit ihren konjugierten Säuren/Basen hält den pH-Wert von Lösungen bei Zugabe geringer Mengen von Säure oder Base annähernd konstant; die Pufferwirkung ist im Bereich des pK_a -Wertes am grössten.