

Elektrophorese 1

Elektrophorese der Serumproteine

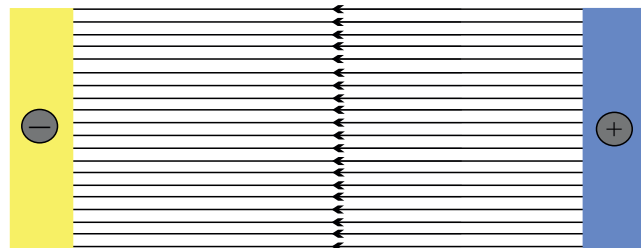
Empirische Daten zeigen, dass die Serumproteine nach dem Start keine weitere Beschleunigung erfahren. Wenn die Beschleunigung den Betrag von $(a) = 0$ hat, dann existieren nach Newton zwei Zustände. Dies ist die Ruhe an sich und die gleichförmig geradlinige Bewegung $(v) = \text{konstant}$. Wenn also $(a) = 0$, dann ist die wirkende Kraft (F) auch null $(F = m \cdot a)$.

Für die Elektrophorese gilt dann, dass die Kraft (F) und die Gegenkraft (R) gleich groß sind $(F = R)$. Das Gleichsein von Kraft und Gegenkraft wird hier durch das Gesetz der Trägheit erklärt. Die auf die Proteine wirkende Kraft resultiert aus der Ladung der Proteine und dem elektrischen Feld (E) der Trennvorrichtung $(F = E \cdot Q)$. Die Gegenkraft ist die Reibung (R) , die von mehreren Faktoren bestimmt wird. Dazu gehören die Wanderungsgeschwindigkeit, die Viskosität und die Molekülgröße der Proteine. Mit zunehmender Geschwindigkeit steigt der Reibungswiderstand. Die Viskosität beschreibt die innere Reibung des Trägermaterials und des verwendeten Puffers. Kleine Eiweißmoleküle erzeugen weniger Widerstand und bewegen sich somit schneller im elektrischen Feld.

Die elektrische Feldstärke (E)

Elektrische Felder können in unterschiedlicher Form auftreten, da jede elektrische Ladung elektrische Feldlinien erzeugt. In dem Verfahren der elektrophoretischen Trennung wird das homogene elektrische Feld des Plattenkondensators genutzt. Jede Platte enthält denselben Betrag an Ladung, aber mit unterschiedlichen Vorzeichen. Für die Stärke des elektrischen Feldes gilt: $(E = U:d)$.

$$E = \frac{U}{d} \quad E = \frac{\text{Volt}}{\text{Abstand}} \quad E = \frac{\text{Volt}}{\text{m}}$$



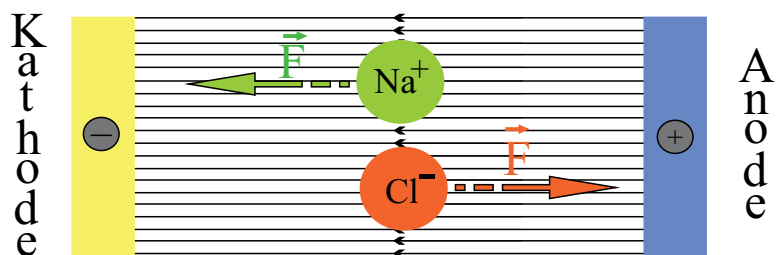
gedachtes homogen elektrisches Feld

Das Vektorfeld der elektrischen Feldstärke

Vektorpfeile geben an, dass die entsprechende Größe einen Betrag und eine Richtung besitzt. Das Vektorfeld ordnet jeder Ladung (q) im Raum den orts- und zeitabhängigen Vektor $(\vec{E})$ der elektrischen Feldstärke zu. Wirkt das elektrische Feld $(\vec{E})$ mit der Kraft $(\vec{F})$ auf ein Teilchen mit der Ladung (q) , dann gilt:

$$\vec{E} = \frac{\vec{F}}{q}$$

$$q \cdot \vec{E} = \vec{F}$$



Bewegung geladener Teilchen

In einem elektrischen Feld bewegen sich Kationen zur Kathode und Anionen zur Anode.

Elektrophorese 2

Die Gegenkraft (R)

Der Kraft des elektrischen Feldes wirken die Viskosität (η), die Teilchengröße und die Geschwindigkeit (v) entgegen. Die Teilchengröße wird idealisiert nach dem Gesetz von Stokes berechnet, in dem der Radius mit 6π multipliziert wird.

$$R = 6\pi r \cdot \eta \cdot v$$

Die Gleichung für die Wanderungsgeschwindigkeit (v)

Es gilt: $F=R$

$$E \cdot Q = 6\pi r \cdot \eta \cdot v \quad / : 6\pi r \cdot \eta$$

$$v = \frac{E \cdot Q}{6\pi r \cdot \eta}$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit (v) ist der elektrischen Feldstärke und der Ladung des Teilchens direkt proportional und der Teilchengröße und Viskosität umgekehrt proportional.

Unter realen Bedingungen haben weitere Faktoren einen Einfluss auf das Ergebnis der gewünschten Trennung der geladenen Teilchen. An erster Stelle steht der Dissoziationsgrad der Teilchen. Aber auch die von großen Teilchen gebildete Hydrathülle behindert die Trennung. Eine Eigenladung des Trägermaterials führt zur Elektroosmose. Poren im Trägermaterial erzeugen Kapillarkräfte und einen Adsorptionseffekt. Eiweiße werden durch die Kraft des elektrischen Feldes deformiert. Die Ionen der Pufferlösung bewegen sich gleichfalls im elektrischen Feld. Kationen des Puffers wandern entgegengesetzt zur Wanderungsrichtung der negativ geladenen Proteine. Durch Reibung entstehende Wärme führt zur Verdunstung und somit zur Veränderung der Konzentration der Pufferlösung.

Die aufgeführten Störfaktoren führen dazu, dass die reale Geschwindigkeit der Teilchen geringer ist als die theoretisch erwartete. Die Störfaktoren können dann vernachlässigt werden, wenn eine gleichbleibende Methodik angewendet wird.

Dissoziationsgrad der Serumproteine

Die Serumproteine lösen sich durch das Bilden einer Hydrathülle im Wasser des Blutplasmas. Die am Bau beteiligten Polypeptidketten nutzen für die Wechselwirkung mit Wasserdipolen ihre dissoziierten Säuregruppen. Durch Verwendung eines alkalischen Puffers wird der Dissoziationsgrad der Proteine verstärkt. Unter physiologischen Bedingungen sind die Proteine weniger negativ geladen. Durch die alkalische Pufferlösung nehmen die negativen Ladungen zu.

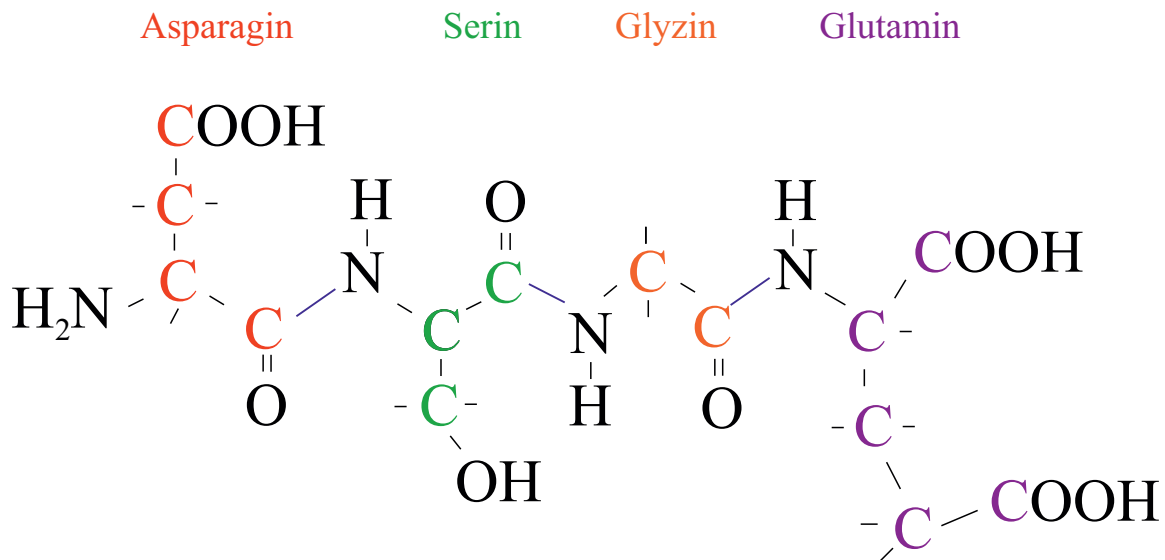
Der Dissoziationsgrad (α) gibt das Verhältnis aus dissoziierten Teilen zur Gesamtteilchenzahl an und beträgt bei einer vollständigen Dissoziation 1.

$$\alpha = \frac{\text{dissoziierte Teilchen}}{\text{Gesamtheit aller Teilchen}}$$

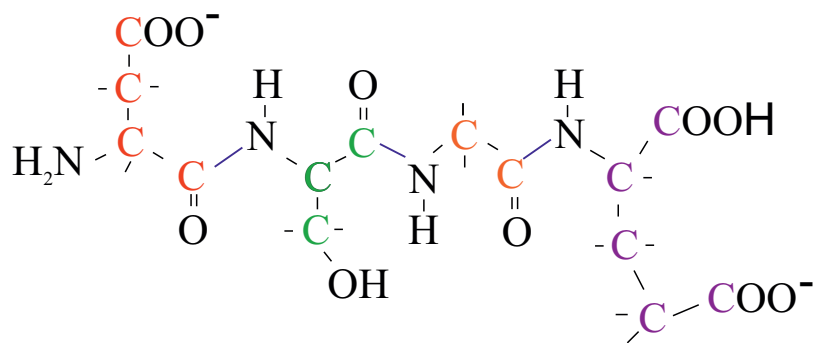
Elektrophorese 3

Polypeptidstruktur

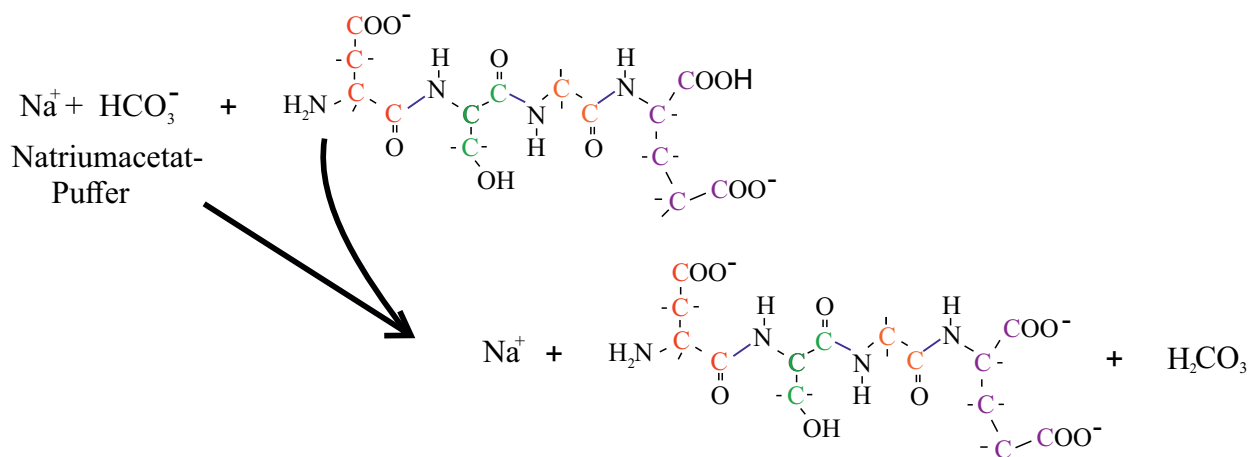
Aminosäuren (AS) oder Aminokarbonsäuren lassen sich durch eine Kondensationsreaktion verknüpfen. Dabei reagiert die Aminogruppe der einen AS mit der Karboxylgruppe der anderen. Die Peptidbindung wird auch mit Karbonsäureamid-Bindung bezeichnet.



Das Tetrapeptid zeigt, dass nur jene Aminosäuren mit mehr als einer Amino- oder Karboxylgruppe zur elektrischen Ladung der Proteine beitragen. Asparagin und Glutamin sind je AS, die über zwei Karboxylgruppen verfügen. Im polaren Lösungsmittel Wasser des Blutplasmas sind die Plasmaproteine durch ihre negative Ladung gelöst.



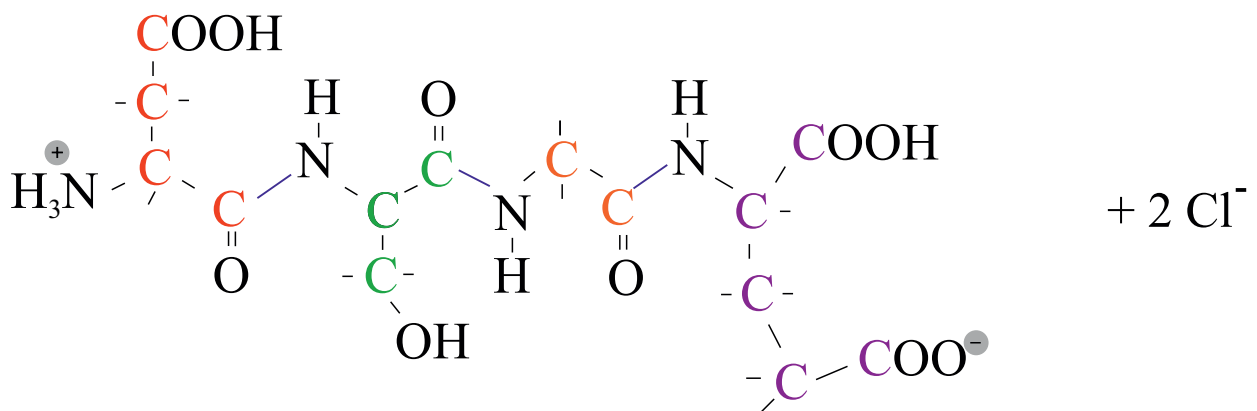
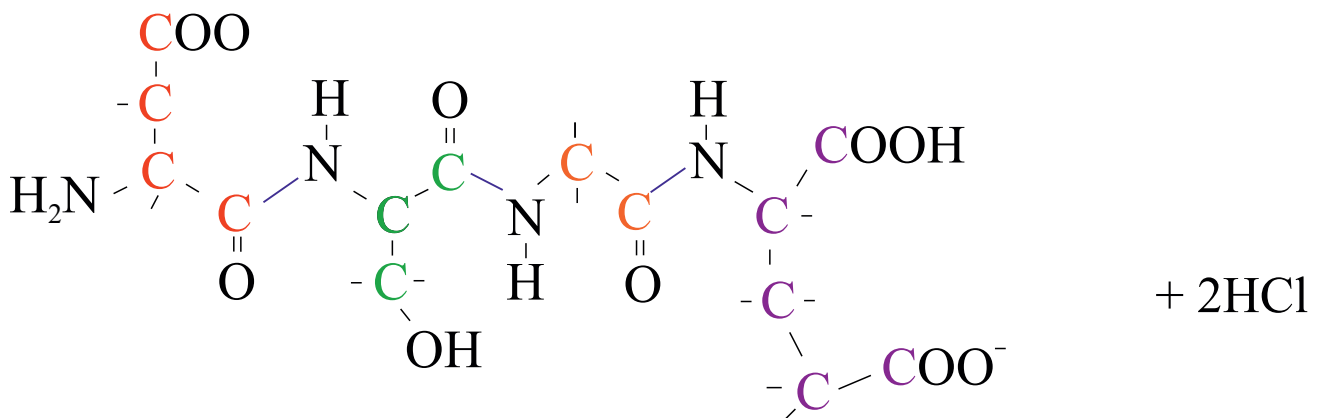
Durch Verwendung einer alkalischen Pufferlösung wird die elektrische Ladung der Proteine verstärkt, weil zuvor nicht dissoziierte Carboxylgruppen unter dem alkalischen Milieu dissoziieren.



Elektrophorese 4

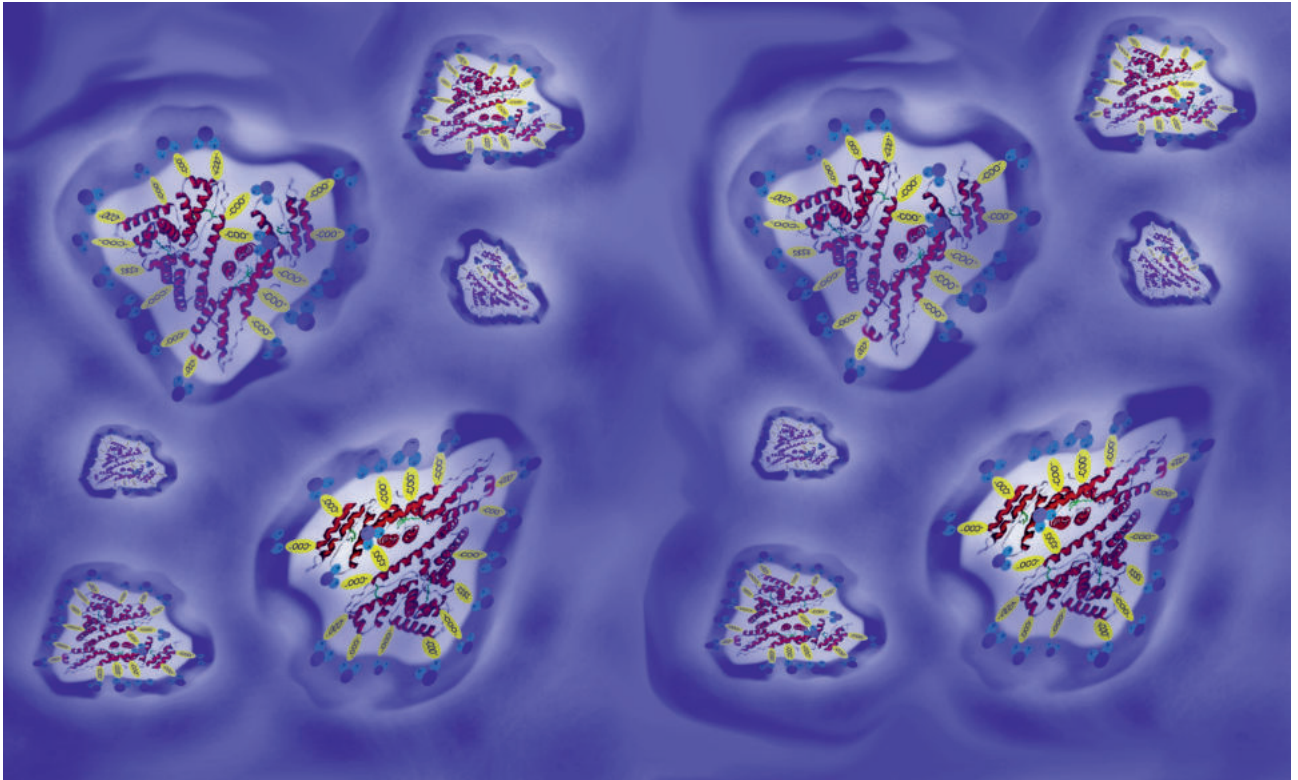
Der isoelektrische Punkt der Proteine

Wie es die Bezeichnung sagt, ist es der Punkt mit dem Zustand der Isoelektrizität am Proteinmolekül. Bei diesem Punkt ist die Zahl der negativen und die der positiven Ladungen gleich. Die resultierende Nettoladung ist null. Jedes Protein hat seinen isoelektrischen Punkt und dieser entspricht einem spezifischen pH-Wert. Beim Blut-pH von 7,4 haben die Plasmaproteine eine negative Ladung, um eine Hydrathülle bilden zu können. Wird zum Blutplasma eine saure Lösung gegeben, dann werden die Proteine durch Fällung sichtbar. Die zugesetzten Wasserstoffionen werden von den dissoziierten Karboxylgruppen aufgenommen und somit reduzieren sich die negativen Ladungspunkte am Proteinmolekül. Gleichzeitig nehmen die Aminogruppen Wasserstoffionen auf und werden zu einem einwertigen Kation. Sind die positiv geladenen Aminogruppen in gleicher Zahl vorhanden wie die negativ geladenen Karboxylgruppen, dann ist durch die Zugabe der sauren Lösung jener pH-Wert erreicht, der dem pKs-Wert des Proteins entspricht. Jetzt sind pH und pKs gleich ($\text{pH}=\text{pKs}$). Der isoelektrische Punkt ist also ein spezifischer pH-Wert, nämlich jener pH, der dem pKs entspricht.

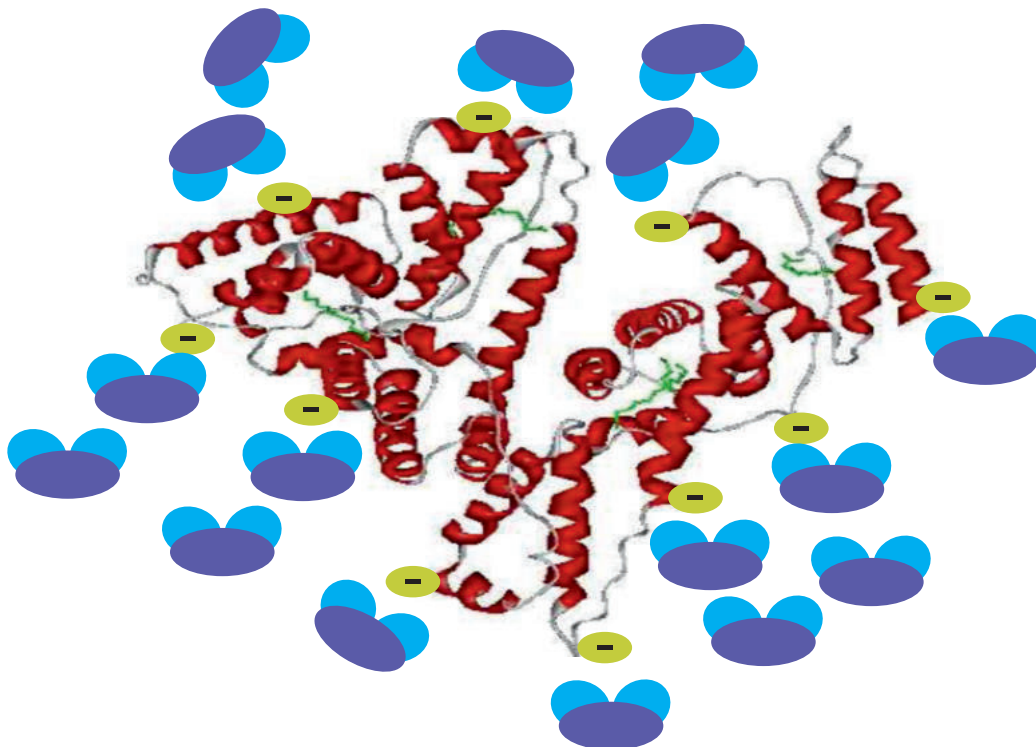


Am isoelektrischen Punkt heben sich die negativen und positiven Ladungen auf.

Elektrophorese 5



Grafische Darstellung der Hydrathülle am Albumin.

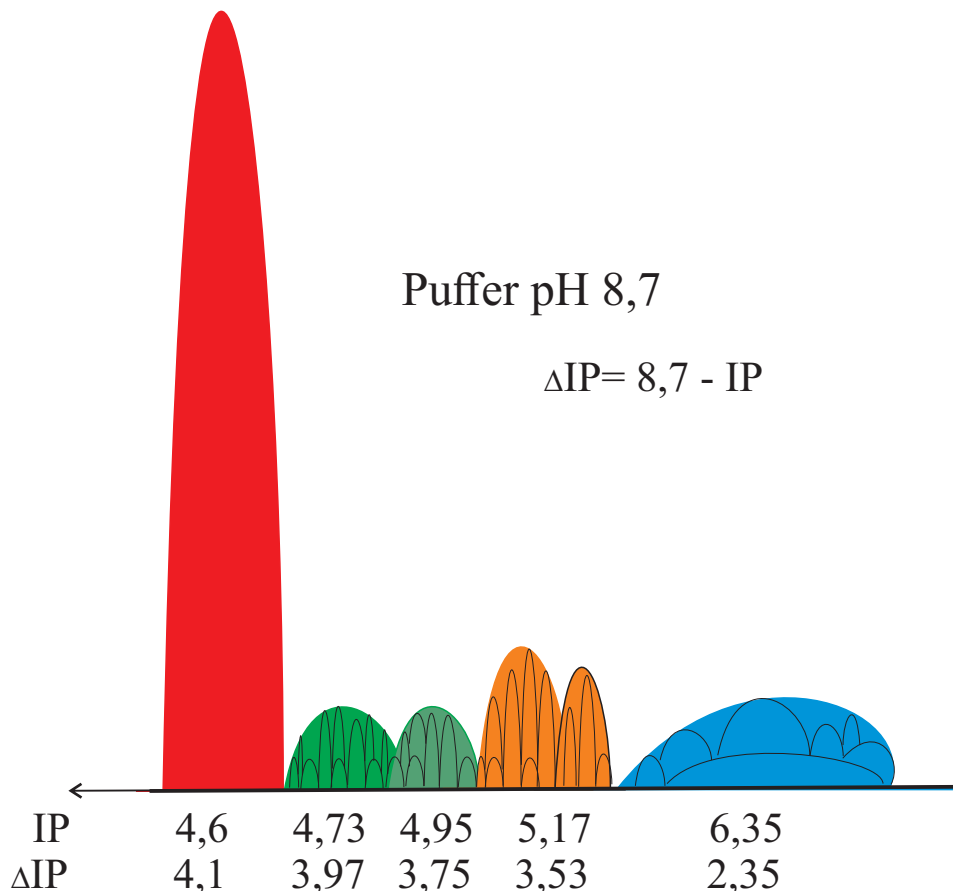


Elektrophorese 6

Am Elektropherogramm werden fünf Proteinfractionen unterschieden. Die Fraktionierung entsteht durch Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit. Das Albumin mit geringsten Molekülgröße und stärksten Ladung legt im elektrischen Feld die größte Strecke zurück. Seine molare Masse liegt bei 66.000 g/Mol und die Ladung ist um den Faktor von 56-mal stärker als die der Gamma-Globuline. Die Differenz zwischen dem pH der Pufferlösung und dem isoelektrischen Punkt (IP) des Albumins ergibt 4,1 (pH Puffer 8,7 und IP 4,6).

Dem Albumin folgen die Proteine der Alpha-1-Fraktion mit dem IP von 4,73. Wie viele Proteine hier verortet sind, das ist nicht bekannt. Durch den IP von 4,95 entsteht die Fraktion Alpha-2. Auch sie besteht aus zahlreichen Einzelproteinen. Die Fraktion der Beta-Globuline kann in zwei Anteilen dargestellt werden. In der Beta-2-Fraktion lagern Proteine des Komplementsystems, deren Anzahl mehr als 30 Einzelproteine beträgt. Aber auch weitere Proteine gehören zu dieser Fraktion. Das Ende bildet die Gamma-Fraktion mit dem IP von 6,35. Hier sind das CrP und die verschiedenen Antikörperklassen enthalten. Ein monomerer Antikörper besitzt eine relative Molekülmasse von etwa 144.000 g/Mol und ist somit deutlich schwerer als das Albumin. Zudem ist die elektrische Ladung im Vergleich zum Albumin deutlich schwächer. Dies erklärt die geringe Wanderungsstrecke dieser Fraktion.

Hinweis: Für die Bewertung eines Elektropherogramms ist das Gewicht der Serumproteine in g/Liter unerlässlich. Speziell der renale Verlust an Proteinen mit geringer Molekülmasse führt zur relativen Erhöhung der Serumproteine mit einer hohen Molekülmasse. Weil auch der Wasseranteil im Serum sich auf das Gesamtprotein auswirkt, ist der Hämatokrit-Wert zu beachten.



Elektrophorese 7

$$\frac{\Delta \text{IP gamma Globuline}}{\Delta \text{IP Alb.}} = \frac{10^{-2,35}}{10^{-4,1}} = 10^{1,7} = 56,2$$

Das Ergebnis gibt an, wie viel Mal das Albumin elektrisch negativer geladen ist als die Proteine der Gamma-Fraktion.

Der IP ist gleich dem pH-Wert, wo die Anzahl der negativen und positiven Ladung gleich groß sind.

$$\text{pH} = \text{IP} + \lg \frac{1 \text{ -COO}^-}{1 \text{ -NH}_3^+}$$

Mögliche Befunde

