

Gaschromatographie (GC):

Analytische Trennmethode, wobei als mobile Phase ein Gas dient. Die Analyten gehen im chromatographischen System durch ihren Dampfdruck in die Gasphase über und wandern in ihr. Sie gehen dabei mit der stationären Phase Wechselwirkungen nach dem Prinzip der Verteilung (stationäre Phase ein Flüssigfilm) oder der Adsorption (stationäre Phase ein Feststoff) ein.

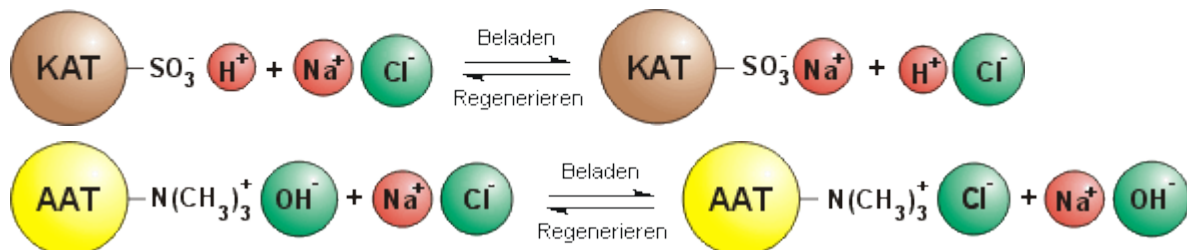
Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC):

Analytische Trennmethode, wobei die stationäre Phase fest, die mobile Phase flüssig ist. Der Unterschied zur "normalen" Flüssigchromatographie ist die hohe Trennleistung, die bei sehr kleinen, druckstabilen Packungsteilchen (<10µm), pulsationsarmen Pumpen für hohe Drücke (bis 400bar), entsprechenden Injektionssystemen und miniaturisierten Detektoren erreicht wird.

Ionenchromatographie (IC):

Variante der Flüssigchromatographie (HPLC), die die Trennung von Ionen ermöglicht. Dazu werden spezielle Säulenmaterialien und Detektoren benötigt. Besonders häufig wird die elektrische Leitfähigkeit zur Detektion genutzt. Die Säulenmaterialien bewirken Trennungen nach verschiedenen Mechanismen (Ionenpaarbildung, Ionenaustausch, Ionenausschluss). Kationen und Anionen werden an unterschiedlichen Säulen und mit verschiedenen Eluenten getrennt.

Entsprechend wird auch unterschieden in **Anionenaustauschchromatographie**, bei der die fixierten Ladungen positiv sind, und **Kationenaustauschchromatographie**, bei der die Ladungen negativ sind. Diese fixierten Ladungen werden durch mobile Ionen der jeweils entgegengesetzten Ladung neutralisiert.



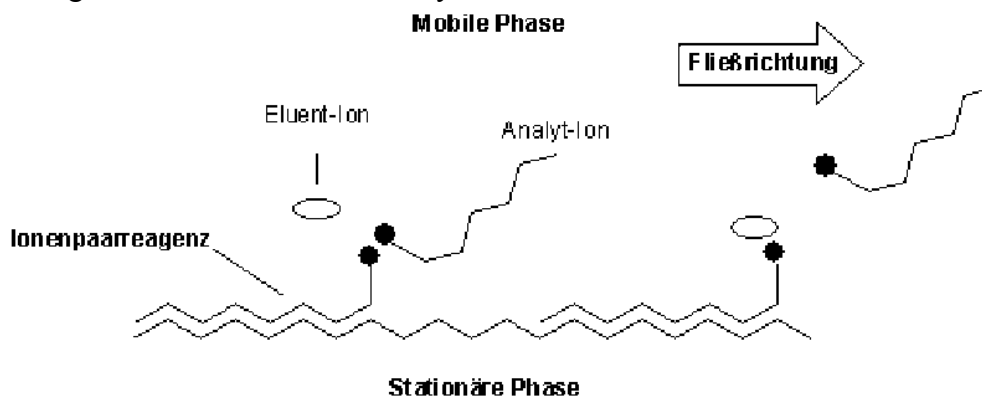
Die Ionenaustauschchromatographie verläuft in zwei Schritten:

1. Bindung der Proteine an die geladenen Gruppen des Säulenmaterials
2. Elution der gebundenen Proteine durch Verdrängung

Im ersten Schritt verdrängen die Proteine das zuvor gebundene mobile Ion aus dem Laufpuffer, im zweiten Schritt werden die gebundenen Proteine durch ein anderes mobiles Ion mit höherer Affinität zu den geladenen Gruppen des Säulenmaterials verdrängt und

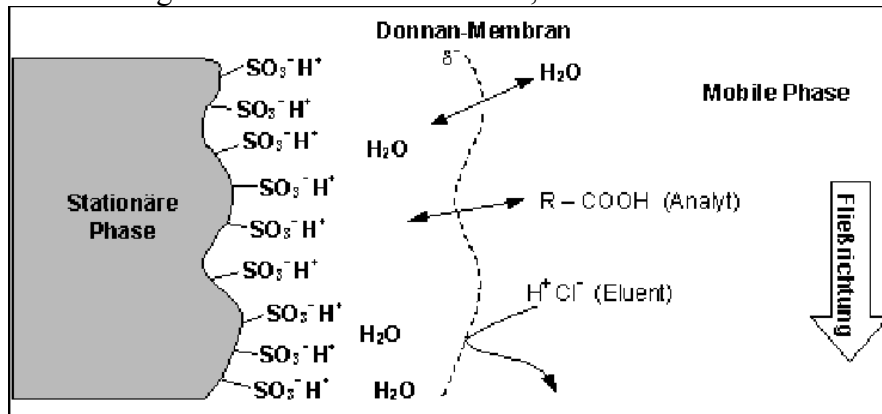
eluierten. Je stärker geladen ein Protein ist, desto besser wird es an das entgegengesetzt geladene Säulenmaterial binden. Einer der wichtigsten Faktoren bei der Ionenaustauschchromatographie ist der pH-Wert des Puffers, da dieser die Nettoladung von Protein und Säulenmaterial bedingt. Liegt der pH in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins, bindet das Protein nur schwach. Der zweite wichtige Faktor ist die Salzkonzentration des Puffers, mit dem das Protein von der Säule eluiert wird. Bei geringer Salzkonzentration werden zunächst die nur schwach an das Säulenmaterial bindenden Proteine eluiert, bei hoher Salzkonzentration eluieren auch die anderen Proteine.

Bei der **Ionenpaarchromatographie** gibt man zu dem Analyten ein bipolares Molekül. D.h. ein Teil ist unpolar und heftet sich an die stationäre Phase, der andere Teil des Moleküls ist stark geladen und bindet den Analyten.



Ionenausschlusschromatographie (IEC)

Das Säulenmaterial besteht aus gebundenen Sulfonsäuregruppen, die an der Oberfläche Wasser binden (Hydrathülle). Diese Hülle (Donnanhülle) kann nur von sehr unpolaren Molekülen durchdrungen werden z.B. schwache Carbonsäuren. Sie werden aufgehalten. Als Fließmittel gibt man starke Säuren hinzu, die verhindert die Dissoziation der Probe.



Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Bei den meisten Proteinen sind die hydrophoben Reste eher im Innern des Proteins, während die hydrophilen Reste auf der Außenseite liegen. Einige Proteine haben aber auch hydrophobe Reste auf ihrer Oberfläche und lassen sich über **hydrophobe Interaktionschromatographie** (HIC) isolieren. Je hydrophober die Außenseite eines Protein ist, desto leichter adsorbiert es an die hydrophobe Säulenmatrix. Die Bindung hydrophober Proteine an die Säulenmatrix wird durch den Zusatz von Salzen zum Chromatographie-Puffer noch verstärkt. Wenn Salze in wässrigen Puffern gelöst werden, verringert sich die Löslichkeit des Proteins entsprechend und die hydrophoben Interaktionen des Proteins mit dem Säulenmaterial nehmen zu. In der Praxis heißt das, ein Protein wird in Gegenwart hoher

Salzkonzentrationen (1,7 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mol/L, 4 KCl mol/L oder 4 mol/L NaCl in gepufferter Lösung) über die HIC-Säule gegeben. Die über hydrophobe Interaktion an die Säule bindenden Proteine werden dann mit einem absteigenden Salzgradienten eluiert. Je weniger hydrophob ein Protein ist, desto eher wird es eluiert.

Die HIC ist im Prinzip der **Reverse-Phase-Chromatographie** (RPC) sehr ähnlich, bei der ja auch die Interaktion hydrophober Reste mit der Säulenmatrix ausgenutzt wird. Während die HIC in der Regel unter nativen Bedingungen durchgeführt wird, ist bei der RPC die mobile Phase eine Mischung aus Wasser und einem weniger polaren Lösungsmittel, das häufig zur Denaturierung des Proteins führt. Das bedeutet, dass für die HIC lediglich die Oberfläche des Proteins für die hydrophobe Interaktion verantwortlich ist und das Protein seine Integrität behält, während bei der RPC auch die hydrophoben Reste im Innern des Proteins in Kontakt mit der Säulenmatrix treten.

Die **Affinitätschromatographie**, eine Säulenchromatographie, dient der Isolierung und Anreicherung von Proteinen oder Nucleinsäuren aus komplexen Gemischen. Ihr Prinzip beruht auf biospezifischen Wechselwirkungen zwischen zwei zueinandergehörigen Reaktionspartnern, wie sie gegeben sind für Protein und Ligand, Antikörper und Antigen, Enzym und Coenzym, Enzym und Substrat oder Nucleinsäure und dazu komplementäre Nucleinsäure. Die Säulenmatrix enthält einen kovalent gebundenen Liganden, an den der zu isolierende Stoff spezifisch bindet und von der er spezifisch eluiert werden kann.

Gelchromatographie

Das Proteingemisch in geeignetem Puffer wird über eine Säule mit einem inerten polymeren Material definierter Porengröße gegeben. Solche Materialien sind z.B. Sephadex, Sephacryl oder auch Agarose, die kommerziell mit verschiedenen Porengrößen hergestellt werden. Proteine unterschiedlicher Größe dringen unterschiedlich weit in diese Poren ein und wandern daher verschieden schnell durch die Säule: je größer das Protein ist, desto schneller wird es durch die Säule wandern. Es legt den kürzesten Weg zurück, wenn es gar nicht in die Poren der Gelpartikel eindringen kann und im so genannten **Ausschlussvolumen** der Säule erscheint, während sehr kleine Proteine vollständig in die Gel-Poren eindringen können und daher sehr viel länger für den Weg durch die Säule benötigen. Wird der Durchlauf in kleinen Fraktionen gesammelt, enthalten diese jeweils nur einen bestimmten Größenbereich der Proteinprobe.