

# Proteinaufreinigung und - gewinnung

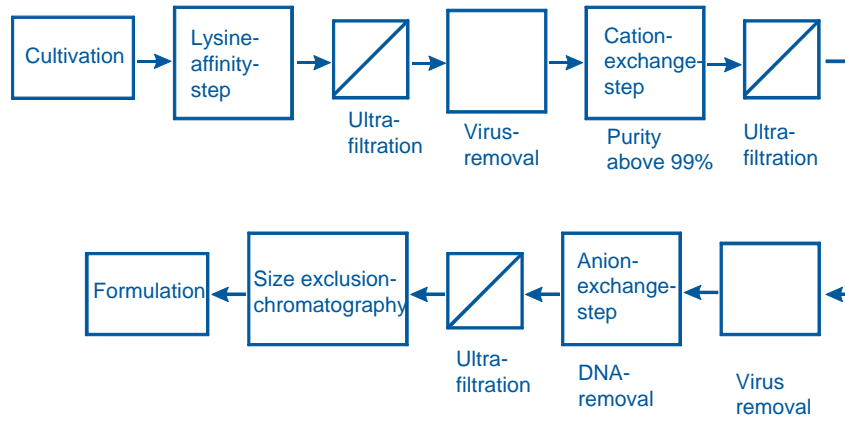
1 - Vorlesung Ursula Rinas

## Protein purification

- Recombinant or „natural“
- Protein for research or for sale  
(one-time or repetitive purification)
- Usage (therapeutic protein or technical enzyme)

2 - Vorlesung Ursula Rinas

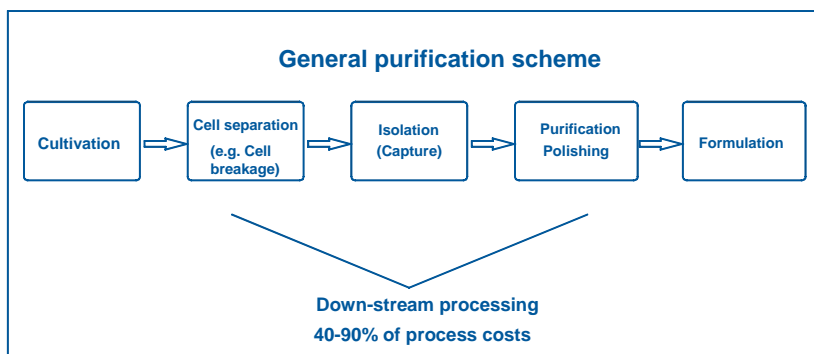
### Purification of recombinant tissue-type plasminogen activator from cell culture



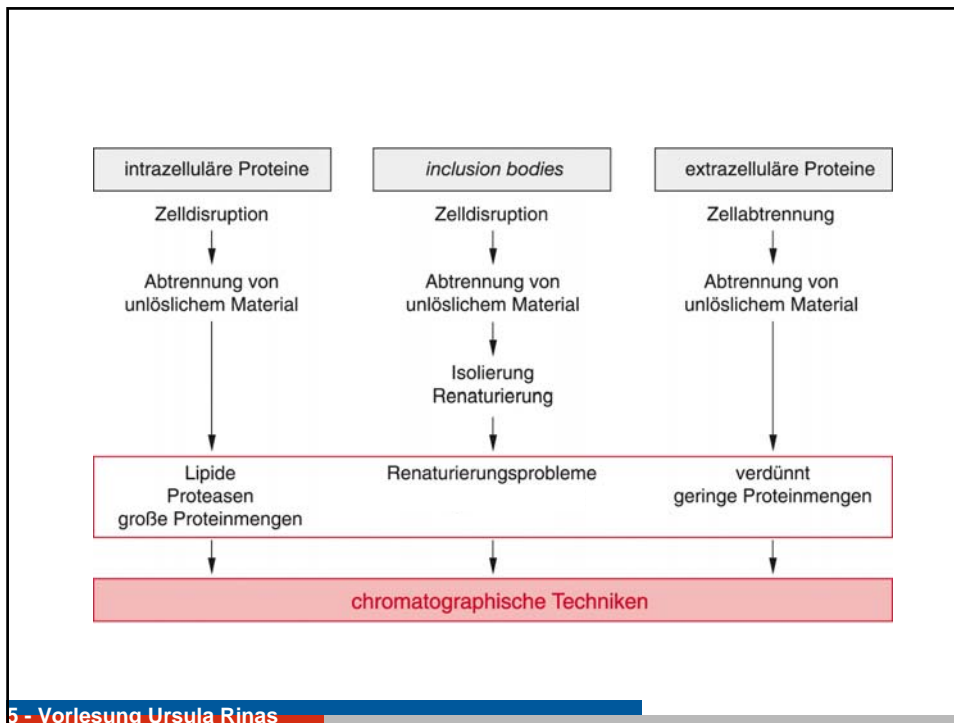
Down-stream processing around 40-50% of total costs

3 - Vorlesung Ursula Rinas

### General purification scheme



4 - Vorlesung Ursula Rinas



5 - Vorlesung Ursula Rinas

# Cell breakage

6 - Vorlesung Ursula Rinas

<u>Microbial</u> <u>Cell</u> <u>Breakage</u>	Physical Methods	Liquid Medium	Freeze/Thaw
			Ultrasound
			Dyno & Colloid Mills
		Gaulin/Manton & French Presses	
		Solid Medium	Ball Mill
	X Press & Hughes Press		
	Chemical Methods	Osmotic pressure change	
		Lyophilization	
		Treatment with acid	
		Detergents	
Biological Methods	Extraction with acetone/toluene		
	Phage		
	Cell-wall digesting enzymes		
		Agents which inhibit cell wall synthesis	

Figure 6.8. Methods for disrupting cells. [From W. Crueger and A. Crueger, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology* (Sinauer, New York, 1982).]

7 - Vorlesung Ursula Rinas

## Protein properties

8 - Vorlesung Ursula Rinas

Charge

Polar – unpolar (hydrophobicity)

Size

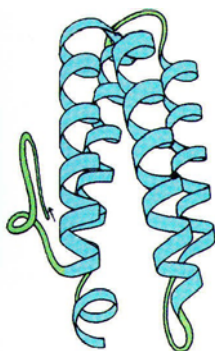
Binding affinities

Stability

.....

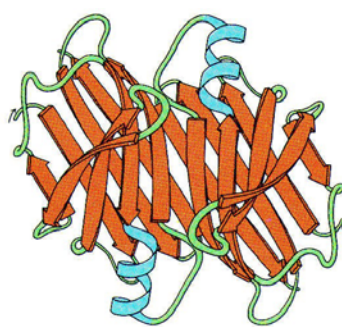
9 - Vorlesung Ursula Rinas

DNA is a macromolecule, a protein is an individuum.....



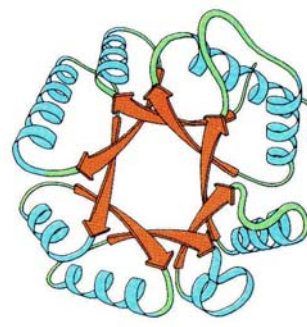
Myohemerythrin

predominantly  $\alpha$  helix



Prealbumin

predominantly  $\beta$  sheet



Pyruvate kinase, domain 1

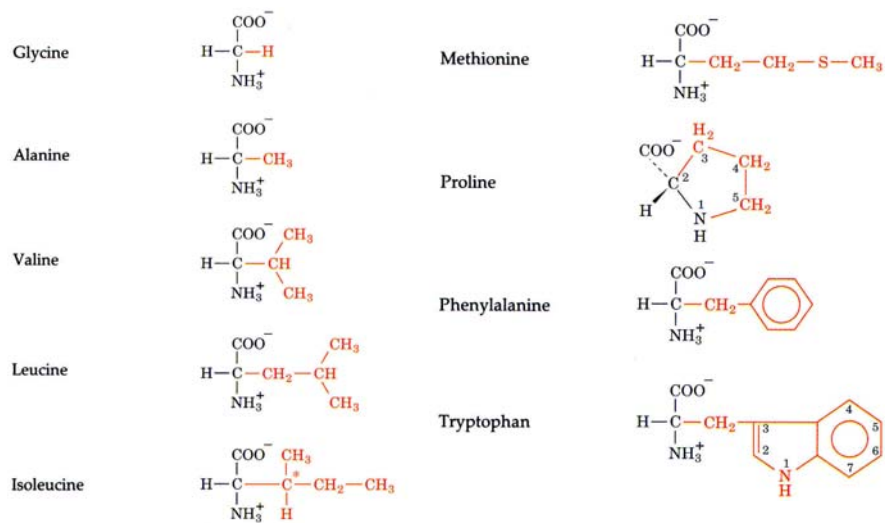
mixed  $\alpha$  helix and  $\beta$  sheet

10 - Vorlesung Ursula Rinas

# Properties of amino acids

11 - Vorlesung Ursula Rinas

## Amino acids with nonpolar side chains



12 - Vorlesung Ursula Rinas



# Methods for protein purification

15 - Vorlesung Ursula Rinas

# Precipitation

16 - Vorlesung Ursula Rinas

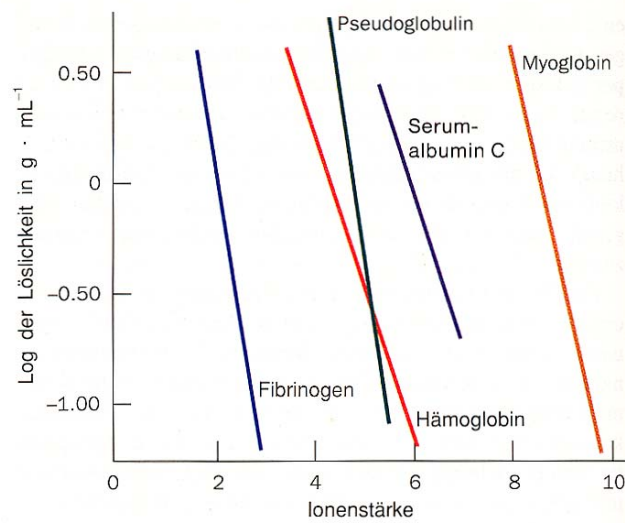
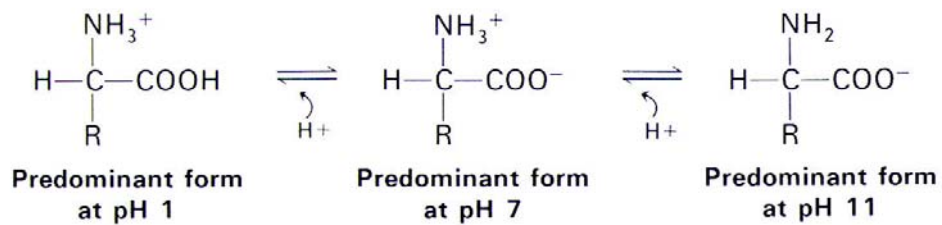


Abb. 5-2 Die Löslichkeiten verschiedener Proteine in Ammonsulfat-Lösungen. [Nach Cohn, E.J. und Edsall, J.T., *Proteins, Amino Acids and Peptides*, S. 602, Academic Press (1943).]

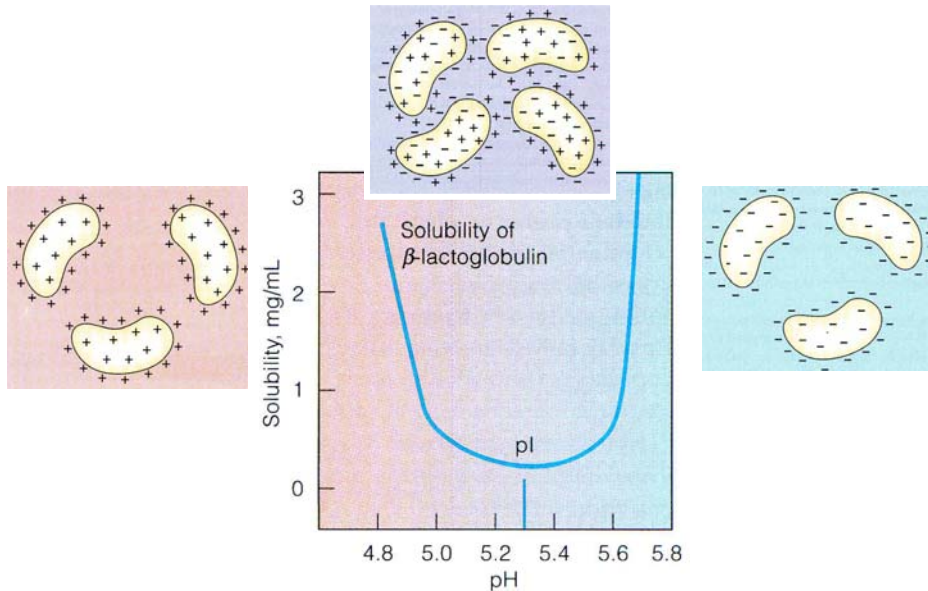
17 - Vorlesung Ursula Rinas

### pH dependence of amino acid charge



18 - Vorlesung Ursula Rinas

## Dependence of protein solubility on pH



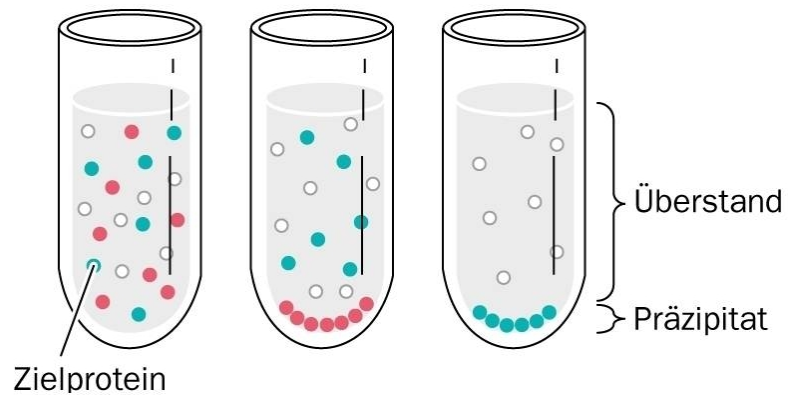
19 - Vorlesung Ursula Rinas

**Tab. 5-1** Die isoelektrischen Punkte häufig vorkommender Proteine

Protein	Isoelektrischer pH-Wert
Pepsin	<1.0
Ovalbumin (Huhn)	4.6
Serum-Albumin (Mensch)	4.9
Tropomyosin	5.1
Insulin (Rind)	5.4
Fibrinogen (Mensch)	5.8
$\gamma$ -Globulin (Mensch)	6.6
Kollagen	6.6
Myoglobin (Pferd)	7.0
Hämoglobin (Mensch)	7.1
Ribonuclease A (Rind)	7.8
Cytochrom <i>c</i> (Pferd)	10.6
Histon (Rind)	10.8
Lysozym (Huhn)	11.0
Salmin (Lachs)	12.1

20 - Vorlesung Ursula Rinas

## Protein precipitation

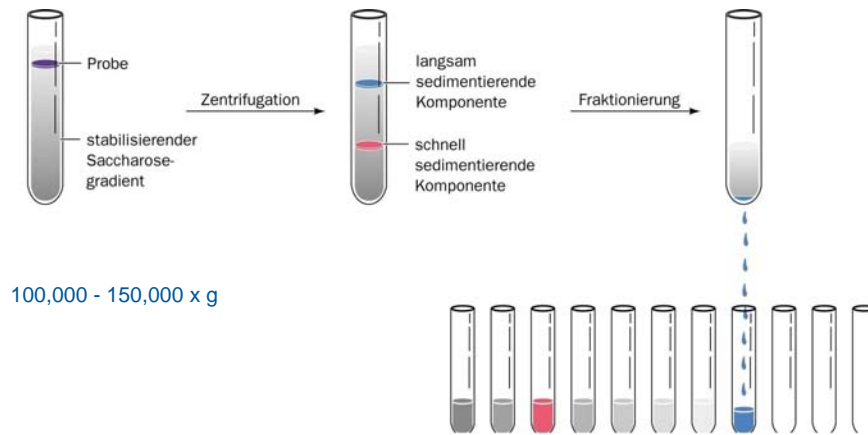


21 - Vorlesung Ursula Rinas

## Sedimentation

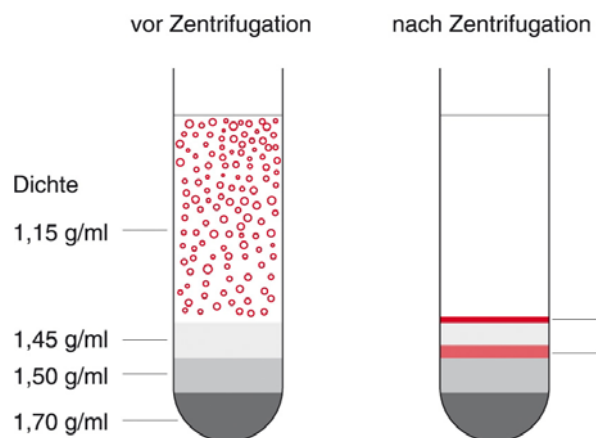
22 - Vorlesung Ursula Rinas

## Ultracentrifugation



23 - Vorlesung Ursula Rinas

## Ultracentrifugation



24 - Vorlesung Ursula Rinas

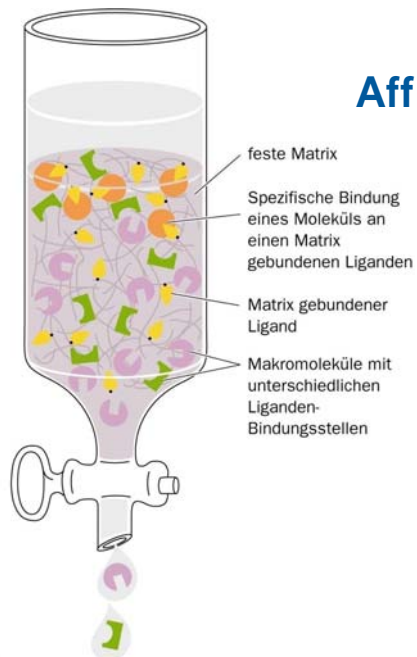
# Chromatography

25 - Vorlesung Ursula Rinas

# Affinity chromatography

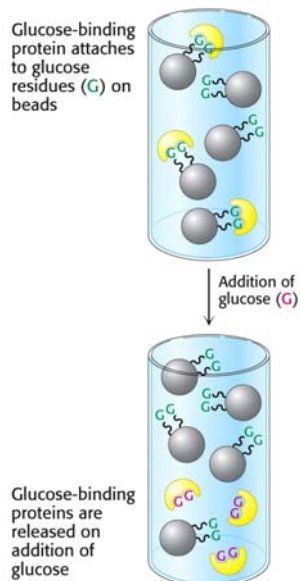
26 - Vorlesung Ursula Rinas

## Affinity chromatography



27 - Vorlesung Ursula Rinas

## Affinity chromatography



Other frequently used affinity tags:

e.g.:

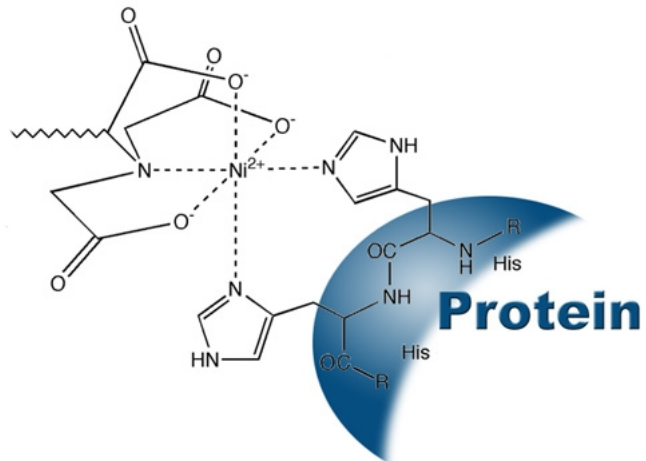
Polyhistidine-tag:  
Ni-chelate column

GST (glutathione-S-transferase):  
glutathione-sepharose column

MBP (Maltose-binding protein):  
amylose-column

28 - Vorlesung Ursula Rinas

## IMAC – Immobilized metal affinity chromatography



Polyhistidine-tag:

Ni-chelate column

29 - Vorlesung Ursula Rinas

## IMAC

Elution with....

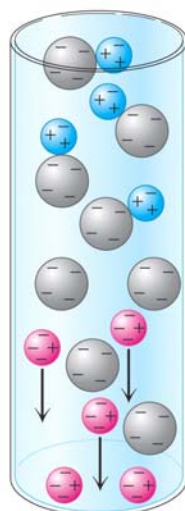


30 - Vorlesung Ursula Rinas

# Ion exchange chromatography

31 - Vorlesung Ursula Rinas

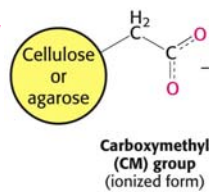
## Ion exchange chromatography



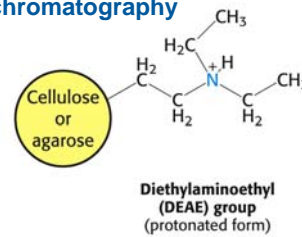
### Cation exchange chromatography

Positively charged protein binds to negatively charged bead

Negatively charged protein flows through



### Anion exchange chromatography



32 - Vorlesung Ursula Rinas

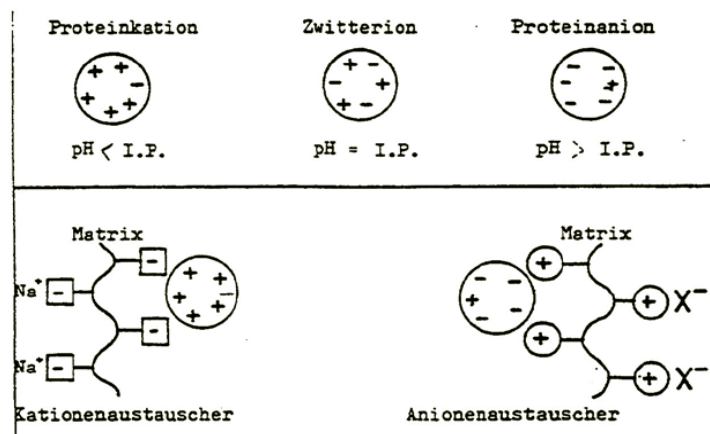
## Ion exchange chromatography

Cation exchange chromatography retains positively charged cations because the stationary phase displays a negatively charged functional group.

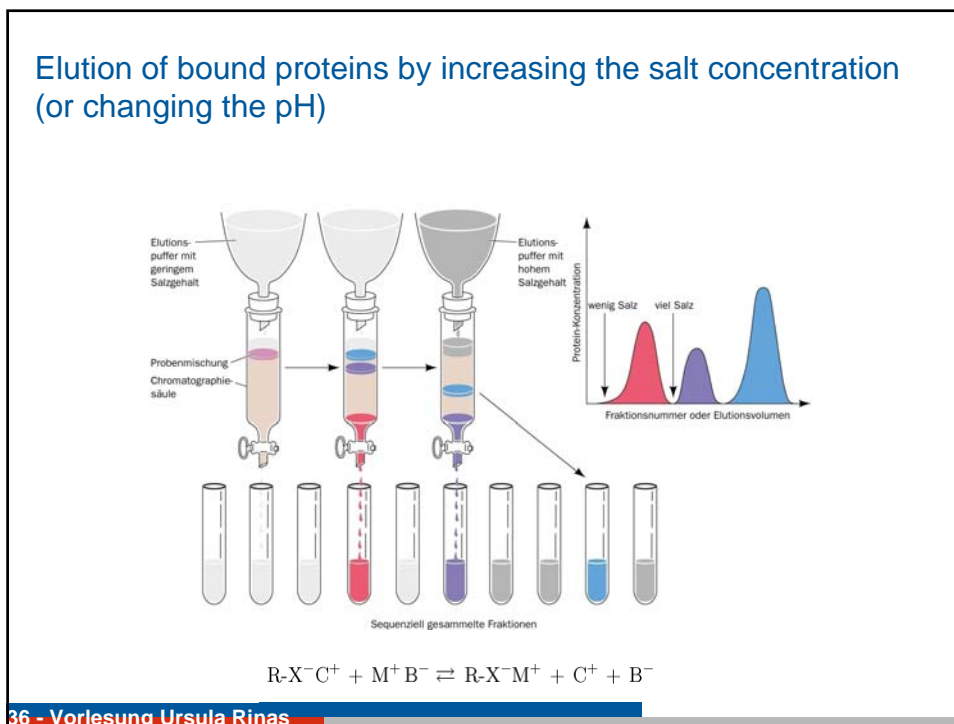
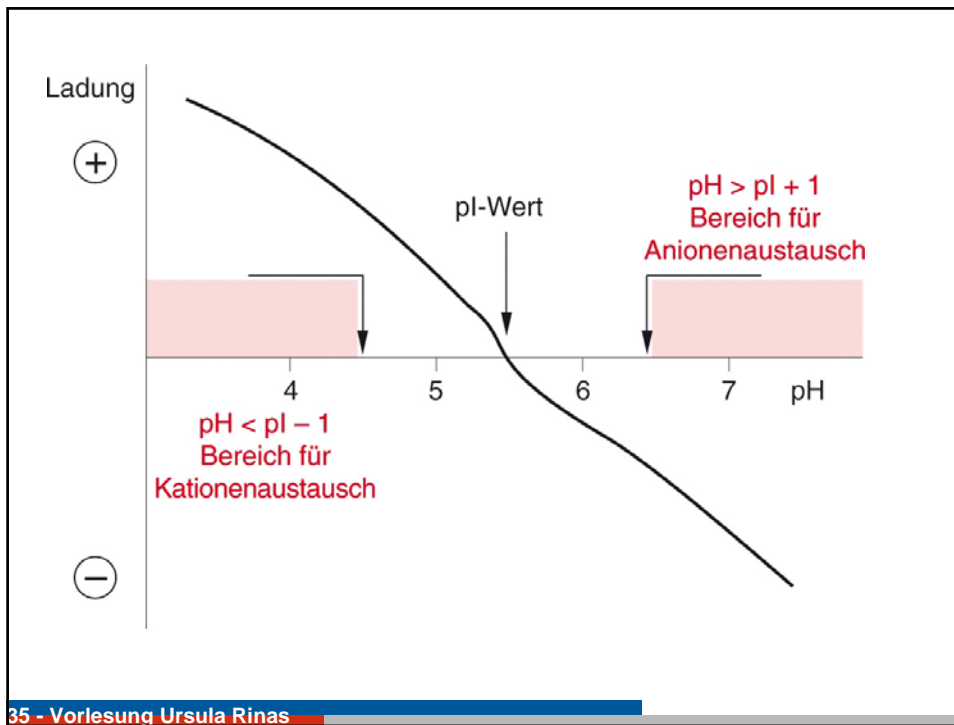
Anion exchange chromatography retains anions using positively charged functional groups.

33 - Vorlesung Ursula Rinas

## Ion exchange chromatography



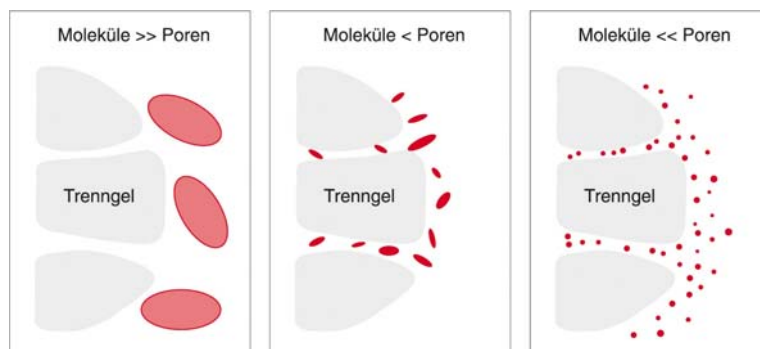
34 - Vorlesung Ursula Rinas



# Size exclusion chromatography

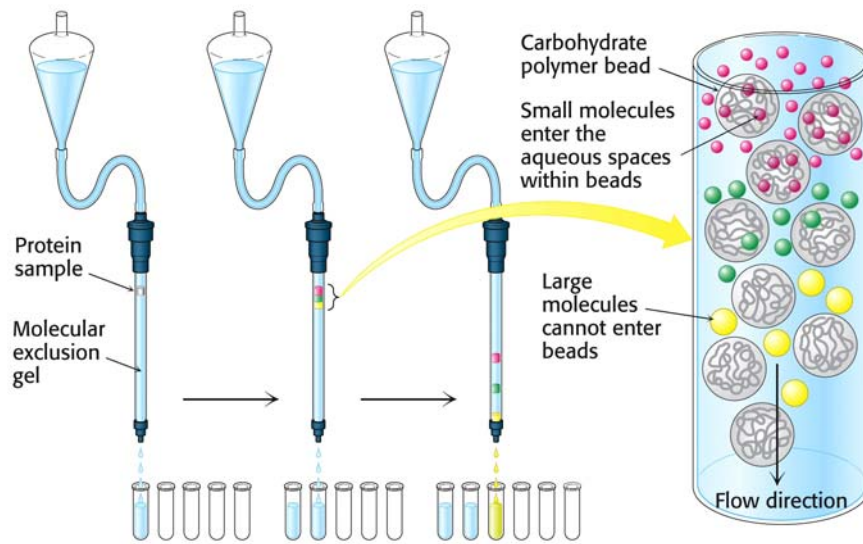
37 - Vorlesung Ursula Rinas

## The principle of size exclusion chromatography



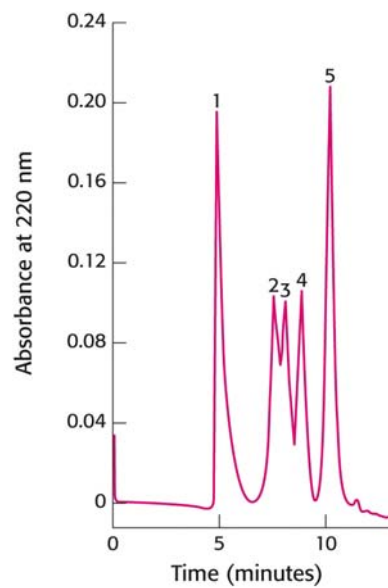
38 - Vorlesung Ursula Rinas

## Size exclusion chromatography

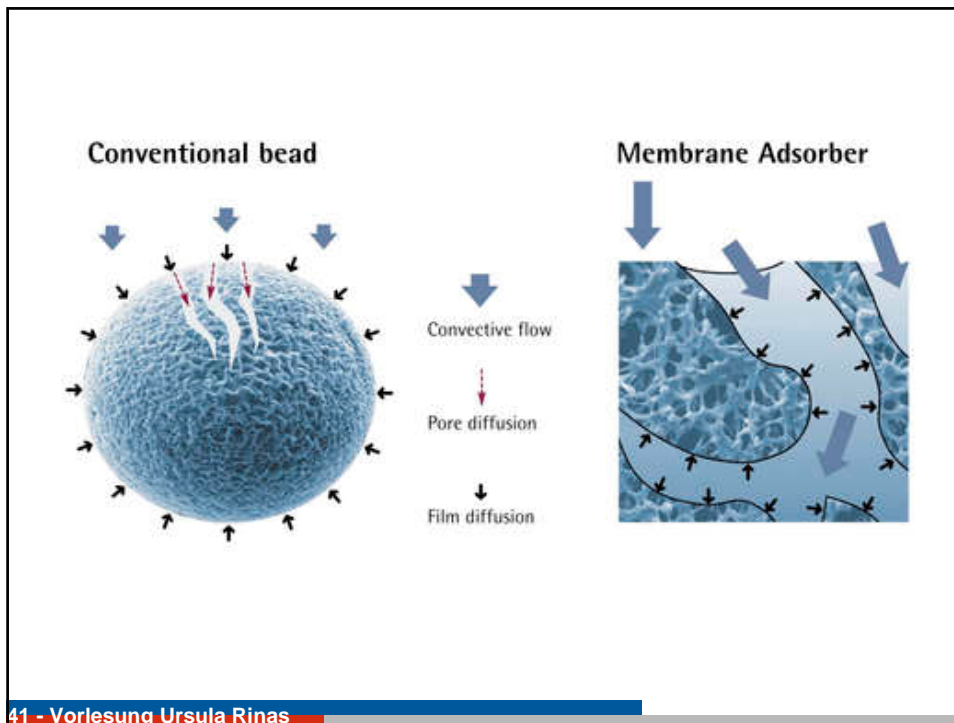


39 - Vorlesung Ursula Rinas

## Elution profile (chromatogram)



40 - Vorlesung Ursula Rinas



**Extraction**

42 - Vorlesung Ursula Rinas

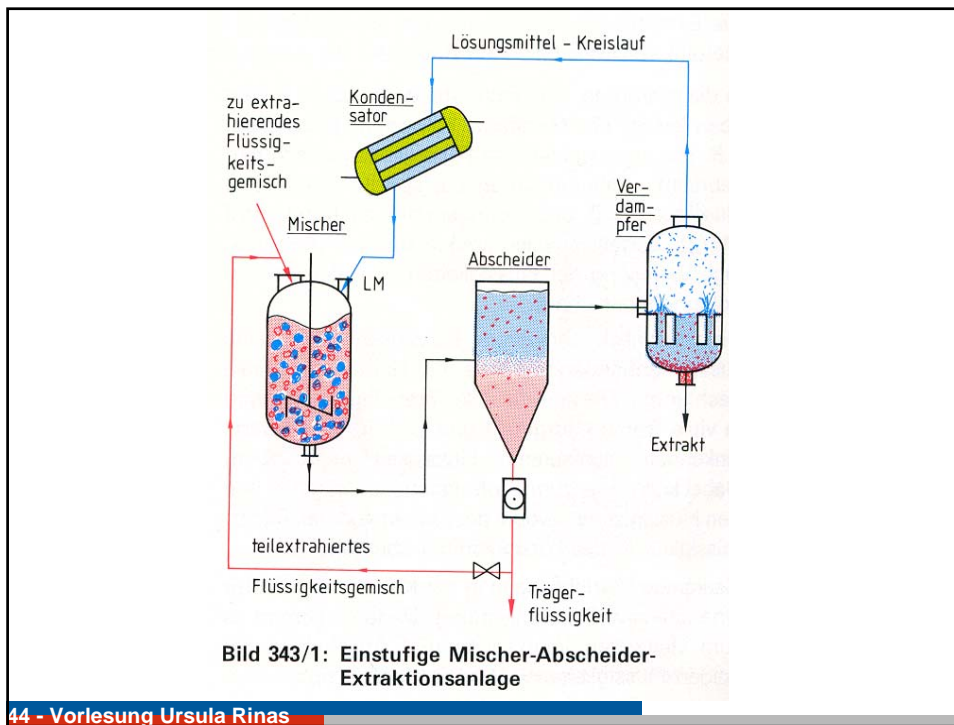
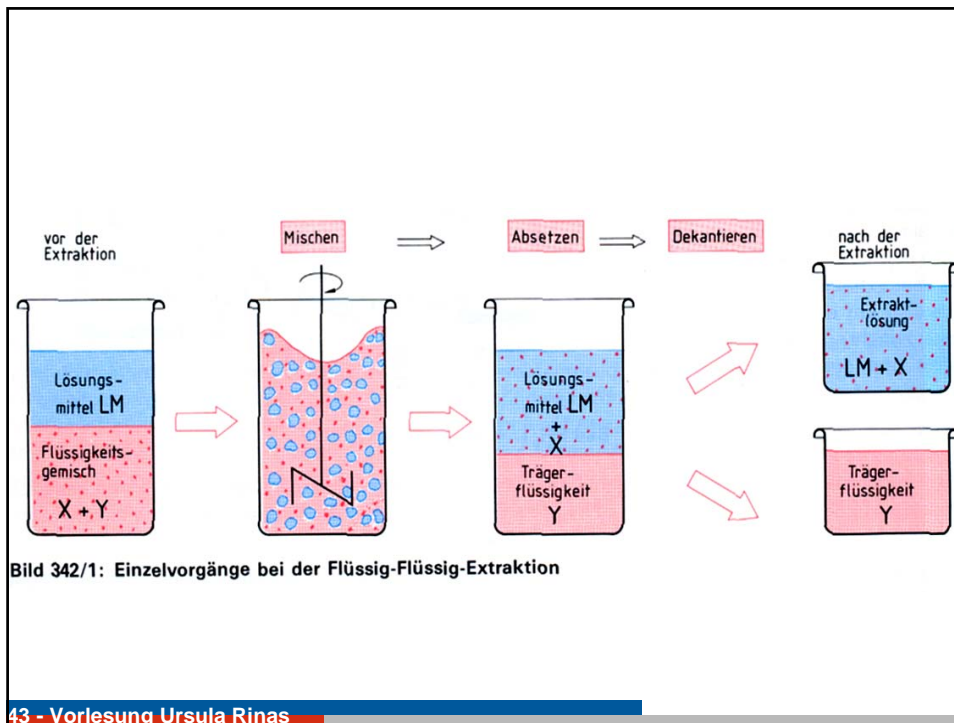


Table 6.6 Two-phase systems formed by incompatibility of neutral polymers in water.

Polymer 1	Polymer 2
Polypropylene glycol	- dextran - hydroxypropyl dextran - methoxypolyethylene glycol - polyethylene glycol - polyvinyl alcohol - polyvinylpyrrolidone
Polyethylene glycol	- polyvinyl alcohol - polyvinylpyrrolidone - dextran - Ficoll
Polyvinyl alcohol	- methylcellulose - hydroxypropyl dextran - dextran
Polyvinylpyrrolidone	- methylcellulose - hydroxypropyl dextran - dextran
Methylcellulose	- hydroxypropyl dextran - dextran
Ethylhydroxyethylcellulose	- dextran
Hydroxypropyl dextran	- dextran
Ficoll	- dextran

45 - Vorlesung Ursula Rinas

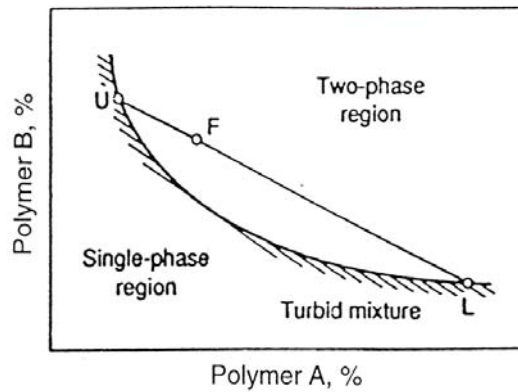


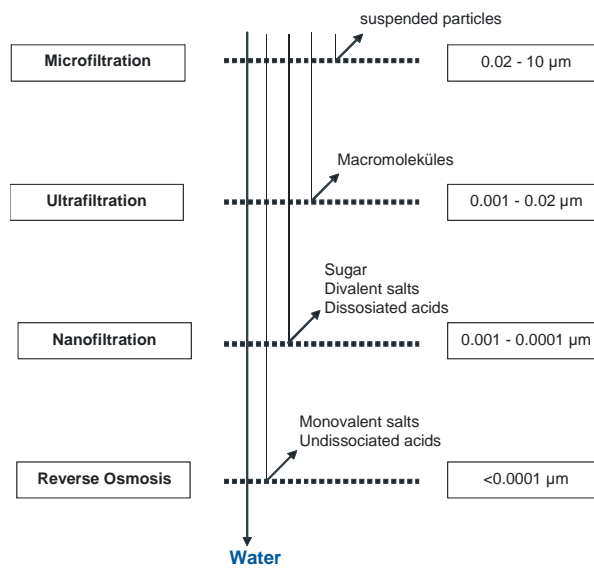
Figure 6.12. Phase diagram of a mixture of two polymers and water. A system with total composition *F* separates into upper phase *U* and lower phase *L*, which are connected on the diagram by the tie line *UL*.

46 - Vorlesung Ursula Rinas

# Filtration

47 - Vorlesung Ursula Rinas

# Filtration

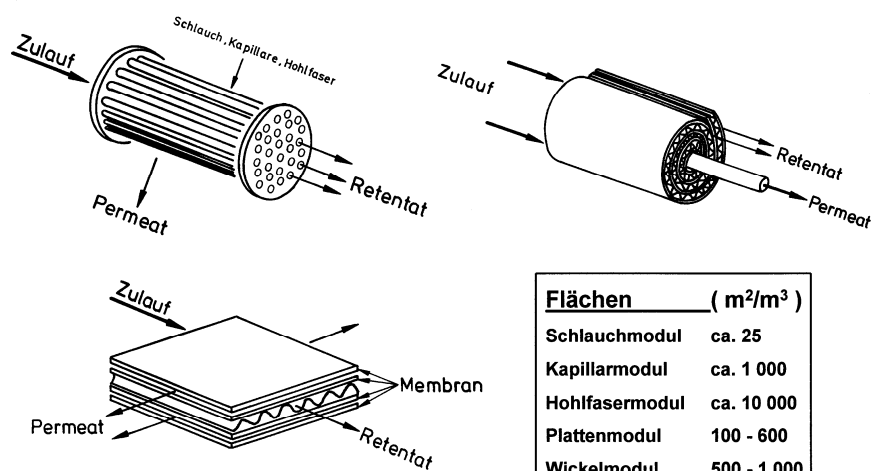


48 - Vorlesung Ursula Rinas

**Tab. 1-1.** Übersicht über die Stofftrennverfahren mit Membranen.

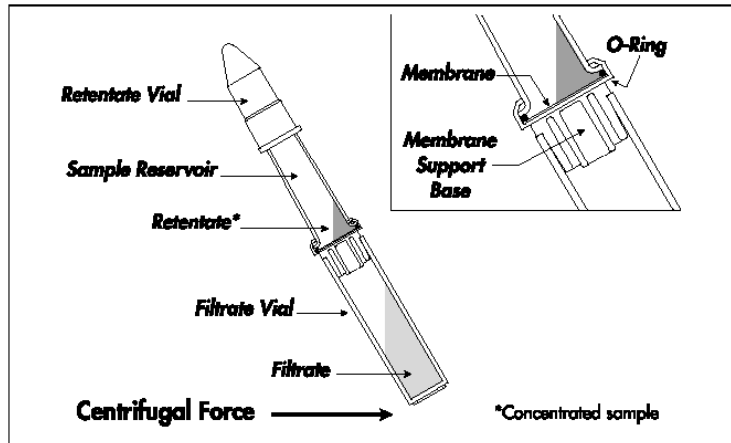
Membranverfahren	treibende Kraft	Trennmechanismus der Membran	bevorzugte Membranstruktur	Anwendung
Mikrofiltration MF	hydrostatische Druckdifferenz (0,5 bis 5) · 10 <sup>5</sup> Pa	Siebeffekt	symmetrische Porenstruktur, Porengröße 0,1–10 µm	Abtrennen von suspendierten Stoffen
Ultrafiltration UF	hydrostatische Druckdifferenz (3 bis 10) · 10 <sup>5</sup> Pa	Siebeffekt	asymmetrische Porenstruktur, Porengröße der Trennschicht 1–20 nm	Konzentrieren bzw. Fraktionieren von Kolloiden und Makromolekülen
Umkehrosmose RO	hydrostatische Druckdifferenz (10 bis 100) · 10 <sup>5</sup> Pa	molekularer Siebeffekt, unterschiedliche Löslichkeit und Diffusion	asymmetrisch	Aufkonzentration von gelösten Stoffen
Dialyse	Konzentrationsdifferenz	unterschiedliche Löslichkeit und Diffusion	homogen	selektiver Stoffaustausch
Elektrodialyse	elektische Potentialdifferenz	unterschiedliche Löslichkeit und Diffusion aufgrund unterschiedlicher Ladung	Polymermatrix mit positiver oder negativer Ladung	Entsalzen von Lösungen, Abtrennen von Metallionen
Gastrennung	Partialdruckdifferenz (5 bis 150) · 10 <sup>5</sup> Pa	unterschiedliche Löslichkeit und Diffusion	dünne, homogene Polymerschicht auf poröser Struktur	Trennen von Gasen und Dämpfen
Pervaporation	Partialdruckdifferenz bis 1 · 10 <sup>5</sup> Pa	unterschiedliche Löslichkeit und Diffusion	dünne, homogene Polymerschicht auf poröser Struktur	Trennung von Lösungsmitteln und azeotropen Gemischen
Transmembrandestillation	Partialdruckdifferenz bis 1 · 10 <sup>5</sup> Pa	Phasentrennung durch hydrophobe Porenstruktur	mikroporöse Porenstruktur	Wasserentsalzung, Aufkonzentration von wässrigen Lösungen

49 - Vorlesung Ursula Rinas



50 - Vorlesung Ursula Rinas

## Spin columns:

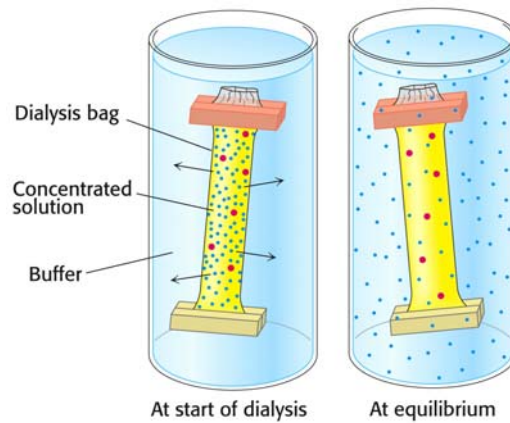


51 - Vorlesung Ursula Rinas

## Dialysis

52 - Vorlesung Ursula Rinas

## Dialysis



53 - Vorlesung Ursula Rinas

## Protein purification

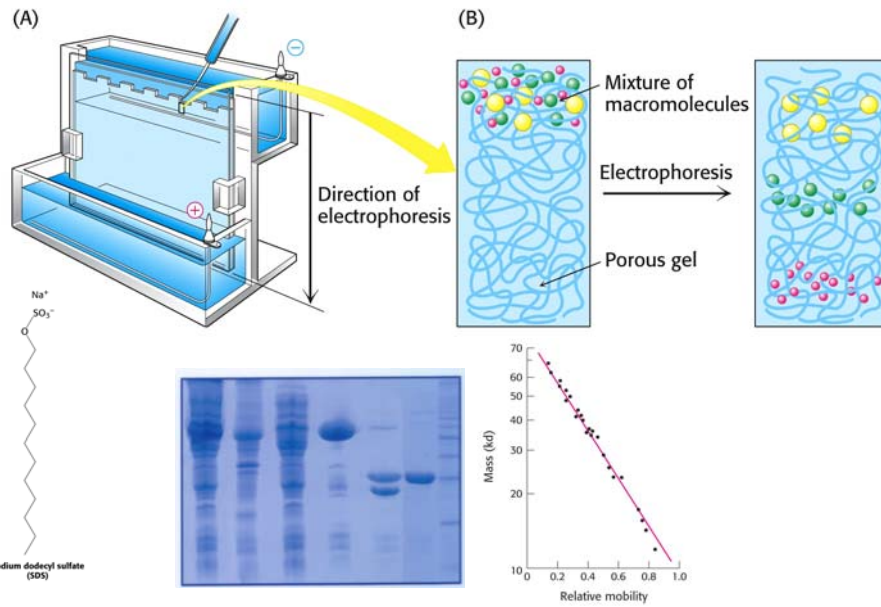
### Not without analytics:

- SDS-PAGE
- Chromatograms
- Activity assay
- N-terminal sequencing
- Mass spectrometry
- Dynamic light scattering

.....

54 - Vorlesung Ursula Rinas

# SDS gel-electrophoresis



55 - Vorlesung Ursula Rinas

# Mass balance

56 - Vorlesung Ursula Rinas

## Protein purification protocol

**TABLE 4.1** Quantification of a purification protocol for a fictitious protein

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity, (units mg <sup>-1</sup> )	Yield (%)	Purification level
Homogenization	15,000	150,000	10	100	1
Salt fractionation	4,600	138,000	30	92	3
Ion-exchange chromatography	1,278	115,500	90	77	9
Molecular exclusion chromatography	68.8	75,000	1,100	50	110
Affinity chromatography	1.75	52,500	30,000	35	3,000

57 - Vorlesung Ursula Rinas

## Proteinreinigung – Die sechs wichtigsten Regeln

- 1.) Wähle Trennschritte, die auf verschiedenen physikalischen Prinzipien beruhen!

*Zwei Aufreinigungsschritte, die auf zwei verschiedenen physikalischen Prinzipien (z.B. Ladung und Größe) beruhen, sind effizienter als mehrmals die gleiche Methode.*

- 2.) Nimm Trenntechniken, die auf die unterschiedlichen Eigenschaften von Produkt und Verunreinigung eingehen!

*Das Wissen über die Eigenschaften aller Komponenten ist wichtig.*

- 3.) Mache den „größten“ Schritt zuerst!

*Gleich zu Beginn darauf achten, dass die Volumenreduktion am größten ist.*

58 - Vorlesung Ursula Rinas

4.) Mache den „teuersten“ Schritt zuletzt!

*Da dies meist der teuerste Schritt ist, sollte hier nur wenig Material (Volumen, Menge) aufgereinigt werden.*

5.) Im Labor kann alles anders als in der Produktion sein.

*Die Arbeitskosten in der Produktion sind höher als im Labor. Die „Zeit“ spielt also eine große Rolle, nicht so die Materialien und Ausrüstungsgegenstände. Aber Vorsicht!*

6.) „KISS“

*keep it simple, safe  
Je weniger Schritte, desto höher die Ausbeute, und je simpler, desto einfacher ist die Herstellung.*

59 - Vorlesung Ursula Rinas

## Quellen

Einige Folien zum Teil abgewandelt nach:

Bioanalytik. Lottspeich F, Engels JF. Spektrum Akademischer Verlag.

Lehrbuch der Biochemie, Voet DJ, Voet JG, Pratt CW. Wiley VCH.

und nach weiteren WWW-Quellen

60 - Vorlesung Ursula Rinas