

# Elektrophorese zur Analyse von Proteinen: Präzision und Leistungsfähigkeit



Simone Schröder, Hermann Wätzig  
Institut für Pharmazeutische Chemie  
TU Braunschweig

# Überblick

---



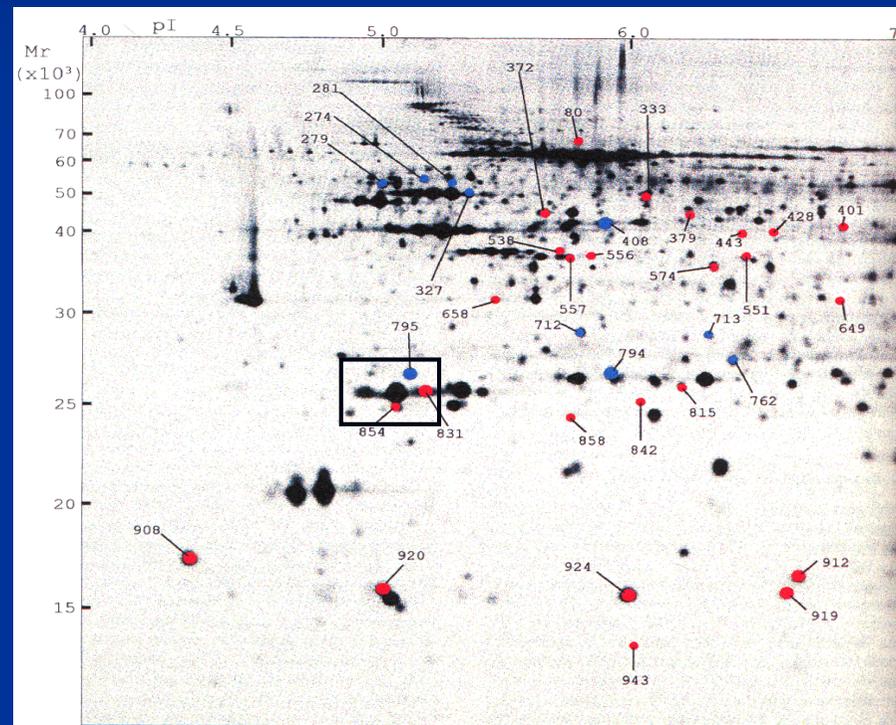
- Proteinanalytik mittels Gelelektrophorese
  - Problematik
  - Präzision
- Detektionsmethoden
  - Native Fluoreszenz
  - NIR Detektion
- Versuchsdesign
  - Plackett - Burman
- Zusammenfassung und Ausblick

# 2D Gelelektrophorese



1. Dimension: IEF

2. Dimension: SDS-PAGE



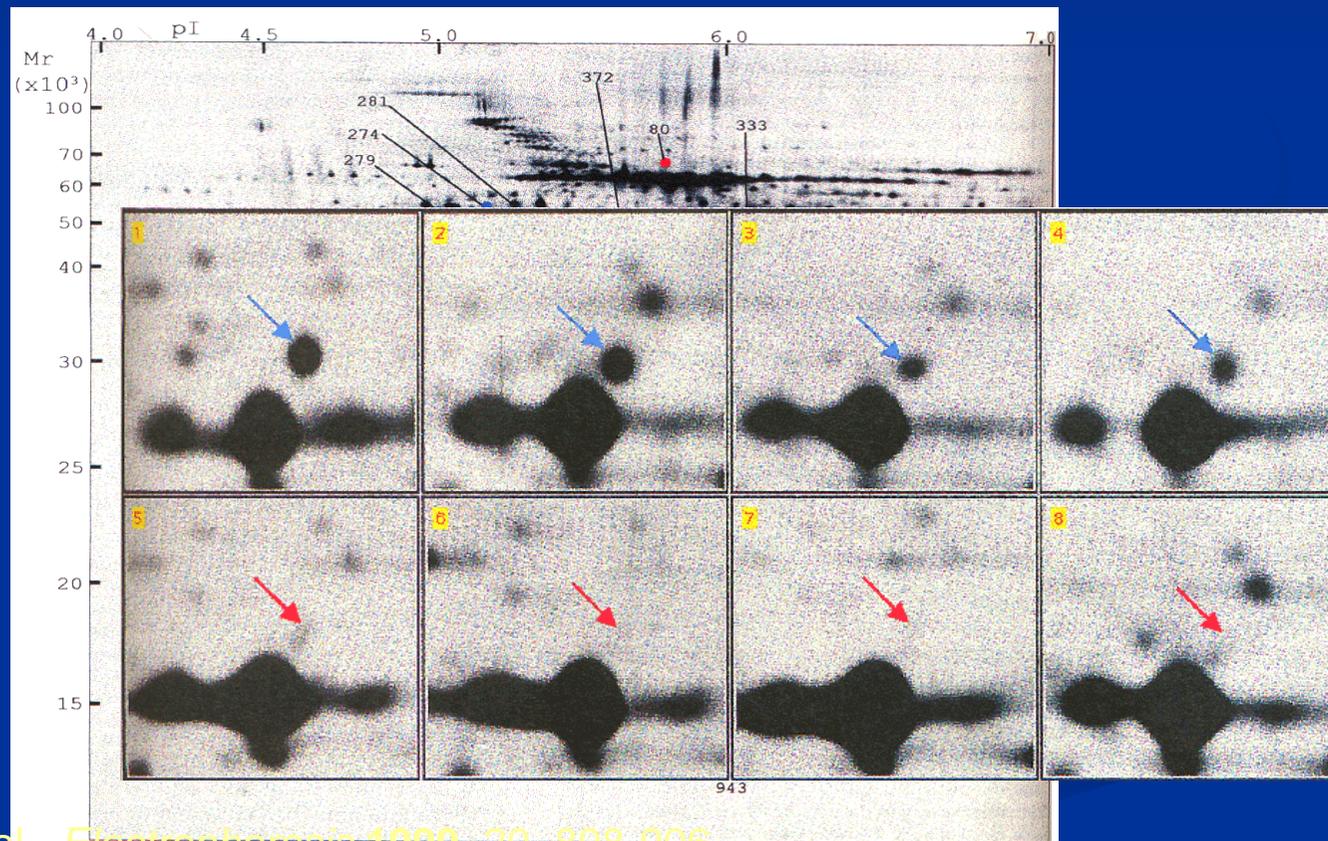
J. Weekes et al., *Electrophoresis* 1999, 20, 898-906

# 2D Gelelektrophorese



1. Dimension: IEF

2. Dimension:  
SDS-PAGE



J. Weekes et al., *Electrophoresis* 1999, 20, 898-906

# 2D Gelelektrophorese

---



- Vorteile:
  - Auftrennung komplexer Proteingemische
  - Trennung tausender Proteine in einem Gel
  - hohe Auflösung
- Anwendung:
  - Klinische Diagnostik
  - Arzneistoffentwicklung

# 2D Gelelektrophorese

---



- Nachteile:
  - lange Analysenzeiten
  - nicht zufriedenstellende Präzision
    - quantitative Unterschiede von Gel zu Gel
    - 13% - 60% RSD% bezogen auf Peakflächen

# Zielsetzung

---

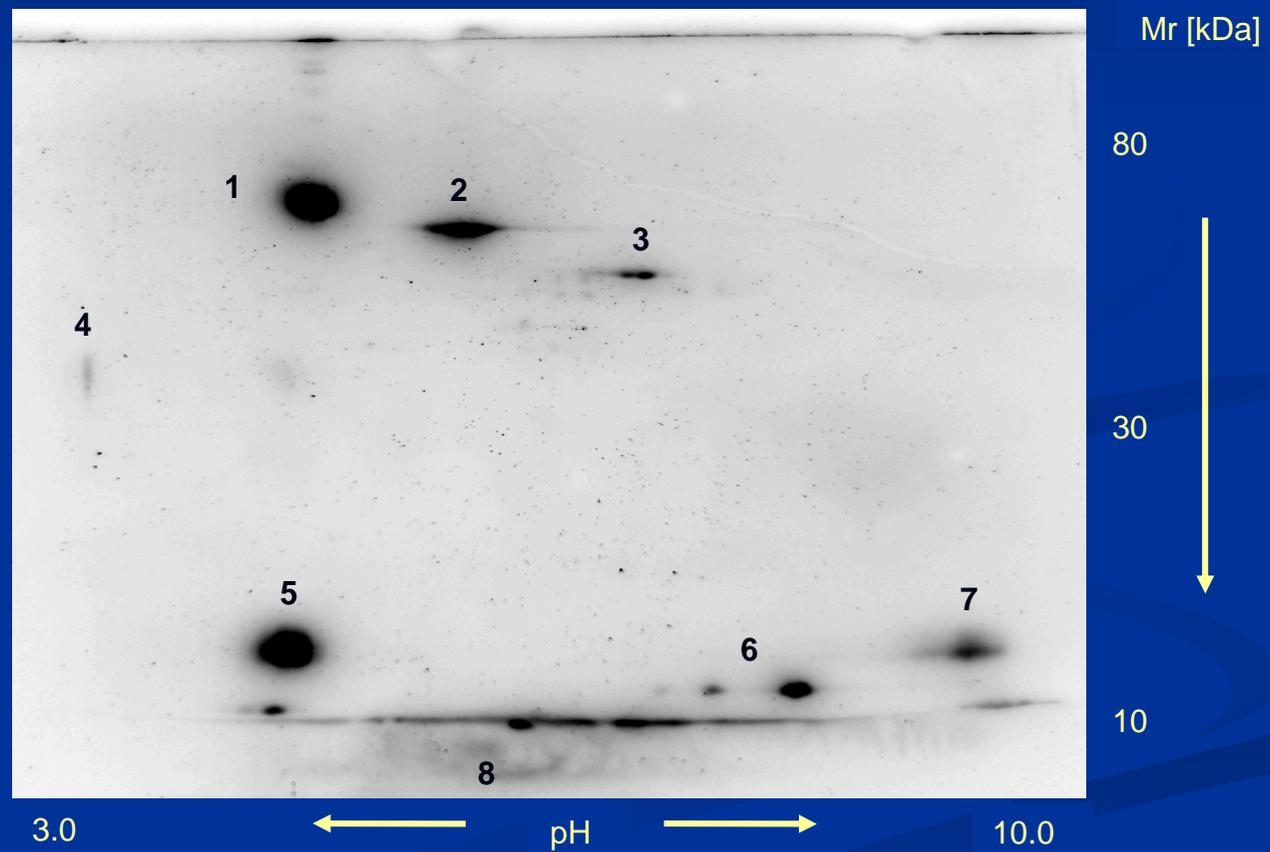


- Analyse der Hauptfehlerquellen
- Verbesserung der Präzision der quantitativen 2D Gelelektrophorese

# Standardgel



- 1: Glucoseoxidase
- 2: Albumin
- 3: Catalase
- 4: Pepsin
- 5:  $\beta$ -Lactoglobulin
- 6: Myoglobin
- 7: Ribonuclease
- 8: Cytochrome C





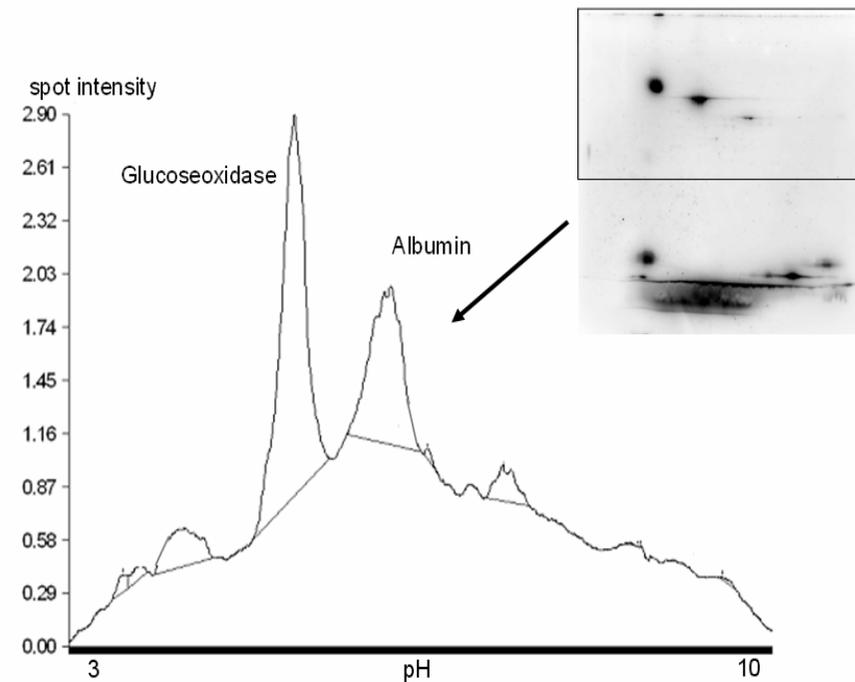
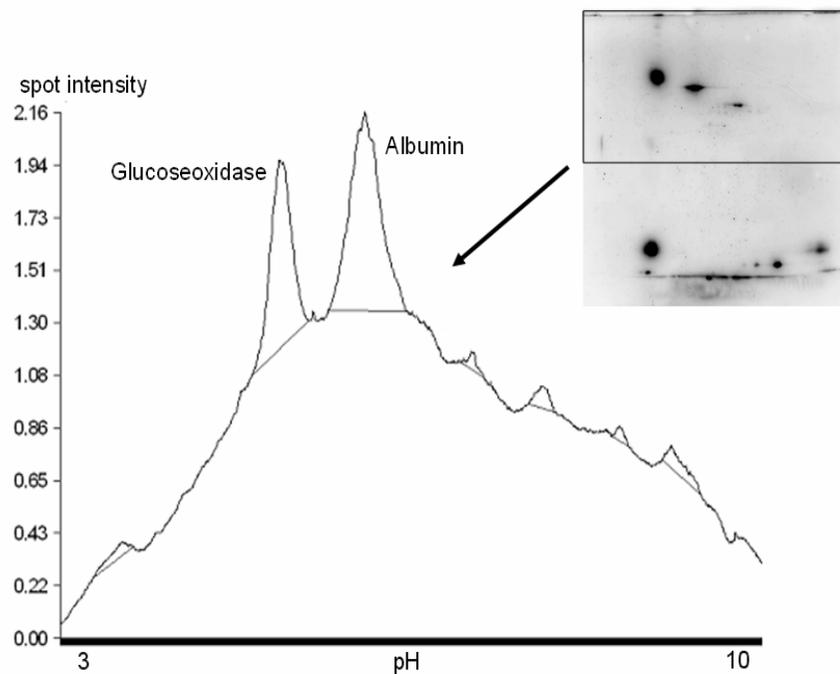
# Detektion

---

- Gelbilder werden um eine Dimension reduziert  
→ Darstellung als Elektropherogramm
- Grauwerte werden mit MATLAB in Zahlen umgewandelt
- **KISS = Korrektes-Integrations-Software-System**  
→ Erstellung und Integration der Elektropherogramme

S. Schröder, H. Zhang, E. S. Yeung, L. Jänsch, C. Zabel, H. Wätzig,  
*J. Proteome Res.* **2008**, 7, 1226-1234

# Fluoreszenzfarbstoff



S. Schröder, H. Zhang, E. S. Yeung, L. Jänsch, C. Zabel, H. Wätzig,  
*J. Proteome Res.* **2008**, 7, 1226-1234

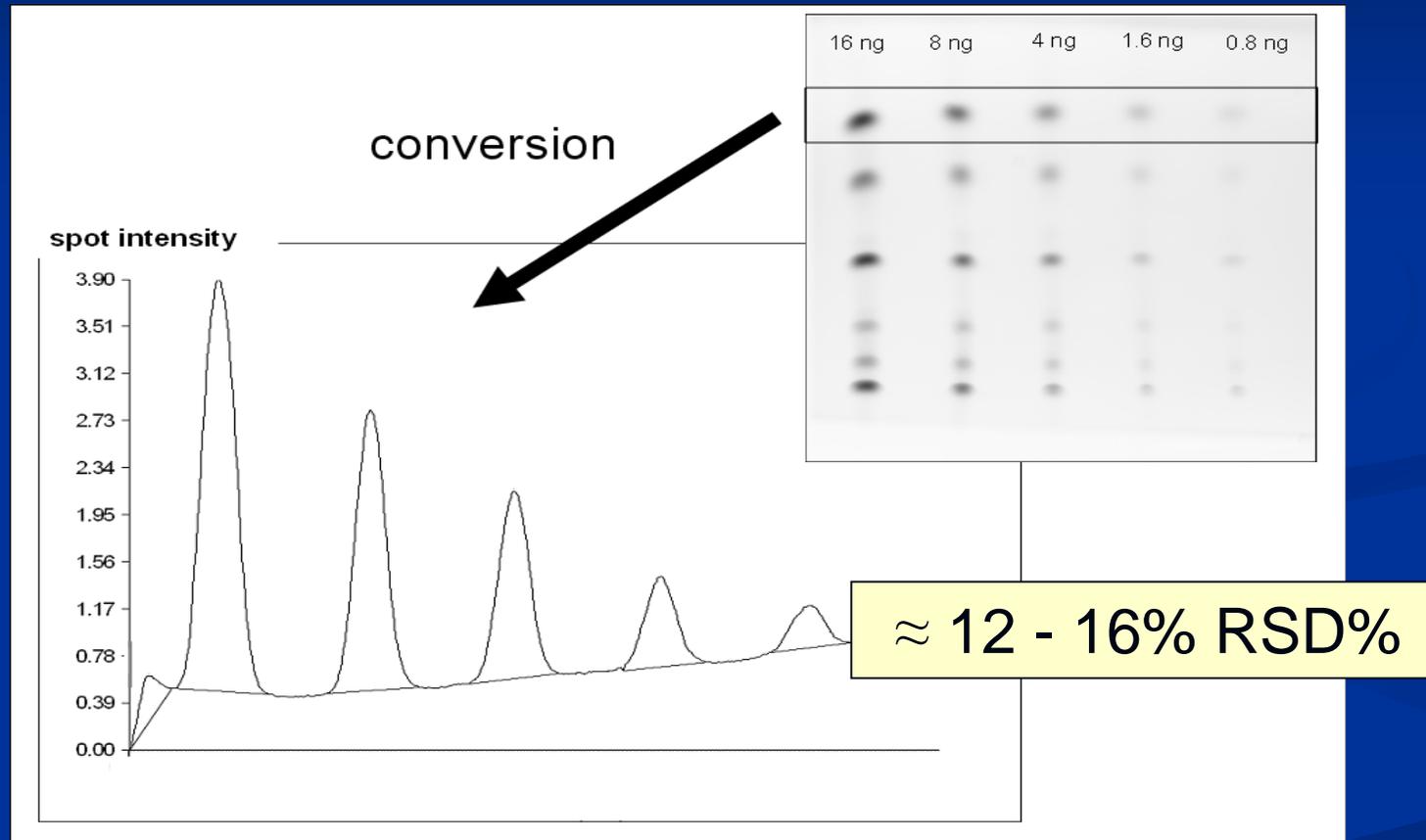


# Native Fluoreszenz

---

- Aromatische Aminosäuren  
(Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin)
- UV-Absorption: 250 - 300 nm
- Fluoreszenz: 300 - 400 nm

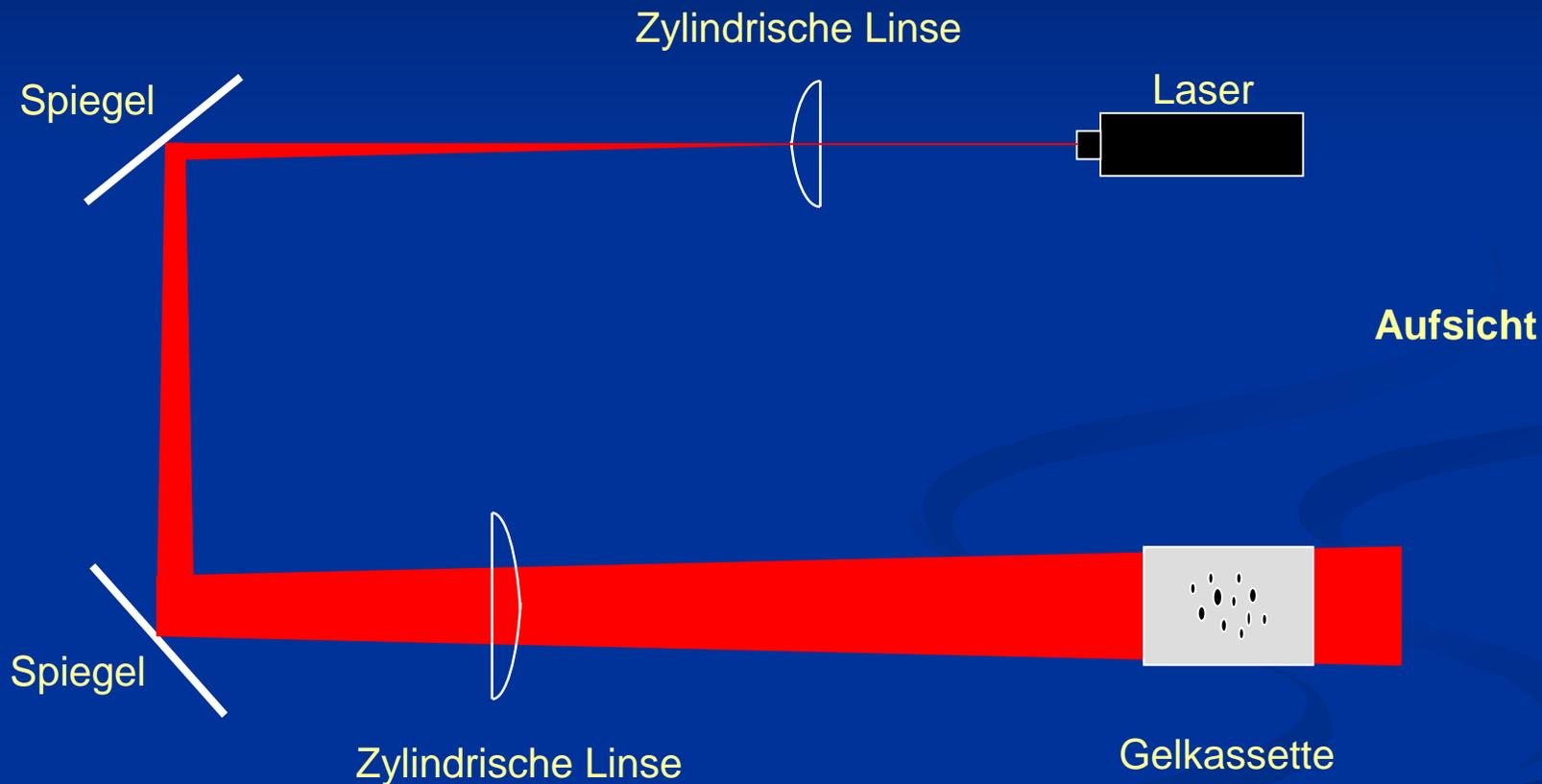
# Native Fluoreszenz



H. Zhang, E. S. Yeung, *Electrophoresis* **2006**, 27, 3609-3618

S. Schröder, A. Schenk, H. Zhang, E. S. Yeung, H. Wätzig, in Vorbereitung

# Native Fluoreszenz



Experimenteller Aufbau für die Fluoreszenzdetektion von Proteinen mittels Laser-Seiteneinstrahlung



# NIR Detektion

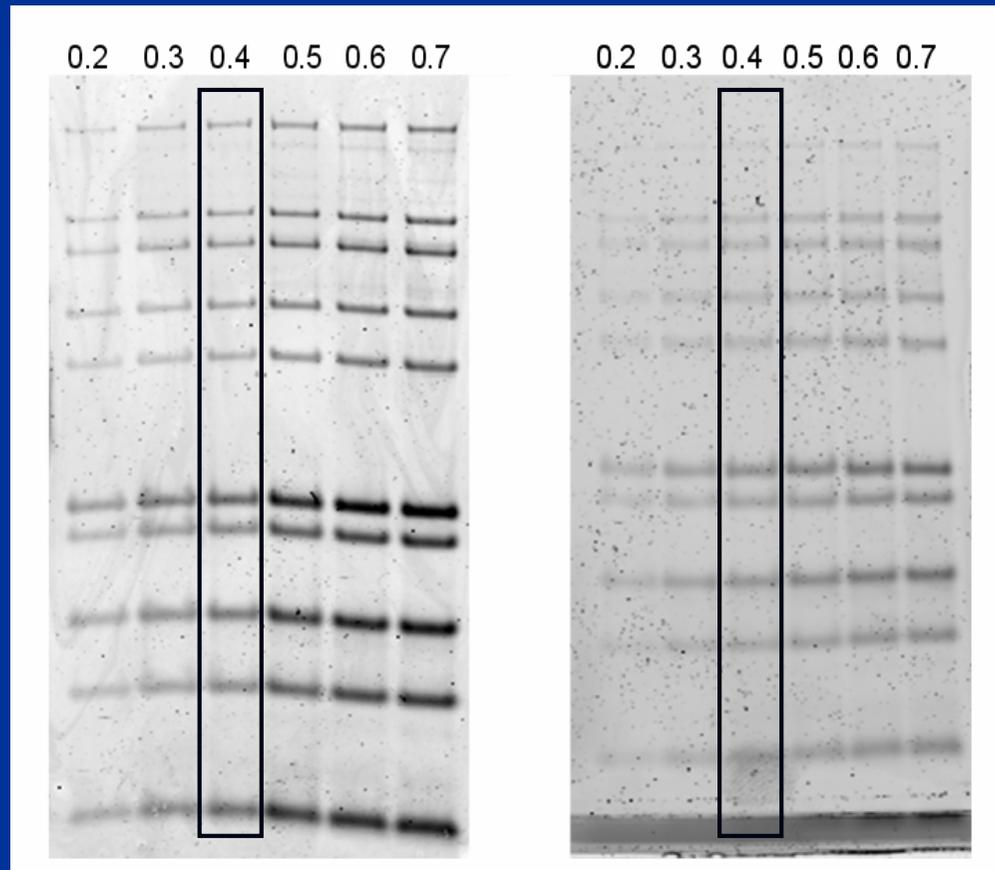
---

- Detektor: Odyssey, LiCor
- Detektion im NIR-Bereich
- Verbesserung des Hintergrundrauschens

# NIR Detektion

- Mark 12™ unstained Standardlösung, Invitrogen
- Coomassie Färbung

NIR Scanner,  
Odyssey, LiCor



Fluoreszenz Scanner,  
Typhoon,  
GE Healthcare



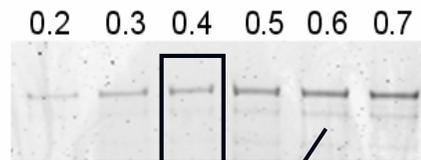
# NIR Detektion

- Mark 12™ unstained Standardlösung, Invitrogen
- Coomassie Färbung

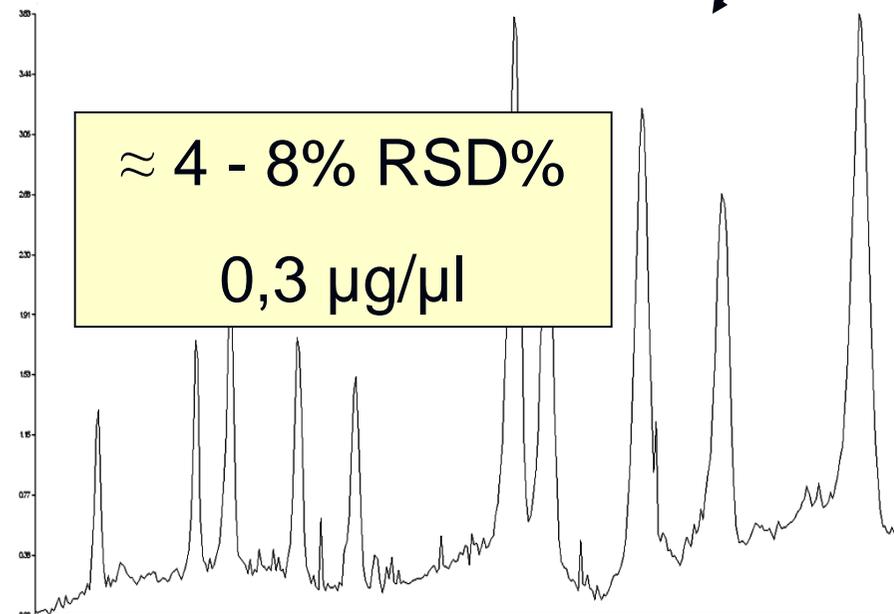
NIR Scanner,  
Odyssey, LiCor

Fluoreszenz Scanner,

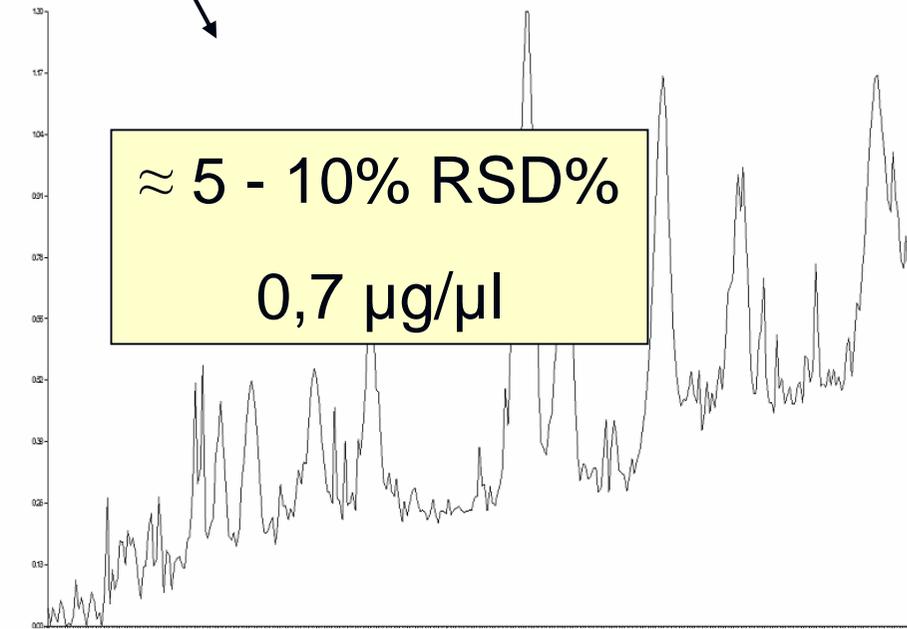
Typhoon,  
GE Healthcare



spot intensity



spot intensity



# Varianzanalyse



<b>total variability in quantitative 2-DE</b>	13 – 60 %
<b>major error sources</b>	
§ transfer between first and second dimension	10 – 15 %
§ visualization:	
staining methods	13 – 70 %
native fluorescence	12 – 16 %
§ analyst	10 %
<b>further minor error sources include:</b> sample preparation, IPG strip rehydration, protein loading, gel scanning, integration software, impact of the gel / interaction between gel and separated proteins, temperature changes etc...	< 10 %

S. Schröder, H. Zhang, E. S. Yeung, L. Jänsch, C. Zabel, H. Wätzig,  
*J. Proteome Res.* **2008**, 7, 1226-1234

# Versuchsdesign

---



- möglichst viele Faktoren auf Signifikanz untersuchen
- relativ grobmaschige Zielsetzung
  - Screening – Versuchsdesign  
(screening = aussieben)
- Plackett – Burman – Versuchsdesign



# Plackett - Burman

---

- reduziert die Anzahl der durchzuführenden Experimente
- Bsp: 6 voneinander unabhängige Parameter
  - normalerweise:  $2^6 = 64$  Versuche
  - Plackett - Burman: 12 Versuche (Anzahl der Versuche:  $n + 4$ , aber immer Vielfaches von Vier)
- Bestimmung der Versuchsvarianz
  - signifikanter Effekt ?
  - genauere Untersuchung dieses Effekts

# Plackett - Burman



Versuchsnr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Versuchsvarianz				Zielgröße
		1	2	3	4	5	6	7	Dummy-Variablen				
		8	9	10	11								
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Summe +													
Summe -													
Gesamtsumme													
Differenz													
Effekt													



# Plackett - Burman

---

## Untersuchung möglicher Fehlerquellen

- 7 Parameter
  - à Plackett-Burman-Versuchsplan mit 12 Versuchen (jeweils 2x à 24 Gele beladen und laufen lassen)
- Probe: Standardproteinmischung (Mark 12™ unstained Standard, Invitrogen), verdünnt mit einem Probenpuffer
- Beladung: pro Gel 6 Taschen à 10 µl
- Detektion:
  - Färbung: BioSafe™ Coomassie, BioRad
  - Entfärbung: Wasser
  - Detektor: Odyssey, LiCor

# Plackett - Burman



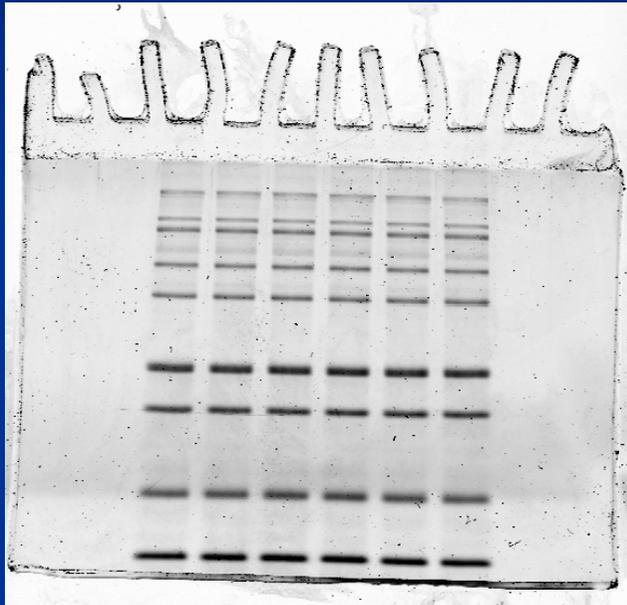
	<b>Einflussfaktoren</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>1</b>	<b>Färbezeit</b>	1 h	5 h
<b>2</b>	<b>Entfärbezeit</b>	2 h	20 h
<b>3</b>	Temp. der <b>Färbelösung/Färbung</b>	KS	RT
<b>4</b>	Temp. der <b>Elektrophorese/Lauf</b>	KS	RT
<b>5</b>	<b>Probenpuffer</b>	SDS (Invitrogen)	LDS (BioRad)
<b>6</b>	<b>Gelalter</b>	alt	neu
<b>7</b>	<b>Gel</b>	pre-casted	self-casted

# Plackett - Burman

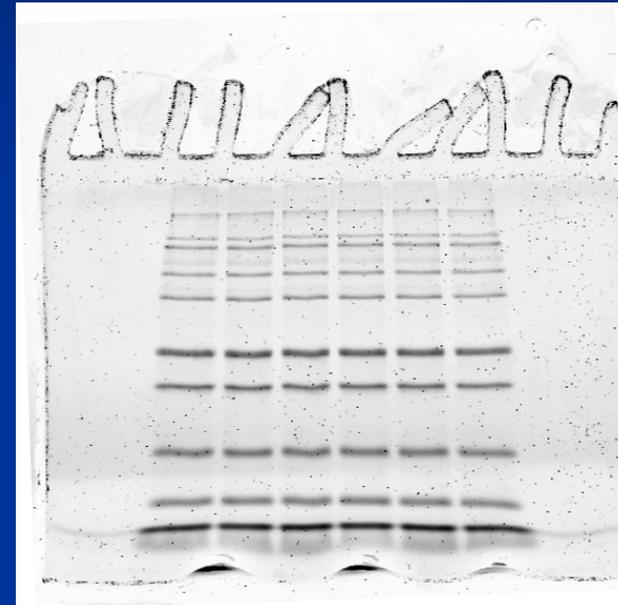


Versuchsnr.	Mittelwert	Einflussfaktoren							Versuchsvarianz				RSD%
		Färbezeit	Entfärbezeit	Temp. Färbung	Temp. Lauf	Proben puffer	Gelalter	Gel	8	9	10	11	
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Summe +													
Summe -													
Gesamtsumme													
Differenz													
Effekt													

# Plackett - Burman



Versuch 7



Versuch 11

- Jedes Gel wurde 5x eingescannt → 10 Bilder pro Versuch
- Jedes Bild enthält 6 Lanes → 60 Lanes = Elektropherogramme pro Versuch
- 12 Versuche à 60 Elektropherogramme → 720 Elektropherogramme
- Jede Lane besteht aus 10 verschiedenen Proteinen → 7200 Peaks

# β-Galaktosidase

		Einflussfaktoren							Varianzen				
Versuchsnr.	Mittelwert	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RSD%
		Färbezeit	Entfärbezeit	Temp. Färbung	Temp. Lauf	Probenpuffer	Gelalter	Gel					
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	20.0
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	6.6
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	10.1
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	13.7
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	17.8
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	0.0
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	4.6
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	8.5
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	25.8
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	7.1
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	8.0
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.0
<b>Summe +</b>	130.85	65.10	95.25	53.80	74.05	68.80	65.75	59.05	69.10	76.85	56.75	46.90	
<b>Summe -</b>	-----	65.75	35.60	77.05	56.80	62.05	65.10	71.80	61.75	54.00	74.10	83.95	
<b>Gesamtsumme</b>	130.85	130.85	130.85	130.85	130.85	130.85	130.85	130.85	130.85	130.85	130.85	130.85	
<b>Differenz</b>	130.85	-0.65	59.65	-23.25	17.25	6.75	0.65	-12.75	7.35	22.85	-17.35	-37.05	
<b>Effekt</b>	21.81	-0.11	<b>9.94</b>	-3.88	2.88	1.13	0.11	-2.13	1.23	3.81	-2.89	-6.18	

1. Effekte der Dummy-Variablen quadrieren und summieren:  $Y_{DV} = (1.23)^2 + (3.81)^2 + (-2.89)^2 + (-6.18)^2 = 62.50$
2. Berechnung der Varianz → durch die Anzahl der Dummy-Variablen dividieren ( $n = 4$ ):  $v_{eff} = 62.50 : 4 = 15.62$
3. Berechnung der Standardabweichung  $s_{eff}$ :  $s_{eff} = \sqrt{v_{eff}} = 3.95$
4. Minimum Significant Factor Effect (MIN) → Multiplikation der  $s_{eff}$  mit dem t-Wert ( $\alpha = 0.10$ ,  $FG = 4$ )

**MIN =  $s_{eff} \cdot t = 8.43$**

# Phosphorylase b

Phosphorylase b		Einflussfaktoren							Varianzen				
Versuchsnr.	Mittelwert	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RSD%
		Färbezeit	Entfärbezeit	Temp. Färbung	Temp. Lauf	Probenpuffer	Gelalter	Gel					
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	8.8
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	5.2
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	3.7
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	7.7
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	12.0
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	29.2
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	6.1
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	7.7
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	22.7
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	7.3
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	9.2
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.2
<b>Summe +</b>	126.45	70.05	63.95	40.60	53.55	82.70	51.00	82.00	82.45	61.20	63.05	65.25	
<b>Summe -</b>	-----	56.40	62.50	85.85	72.90	43.75	75.45	44.45	44.00	65.25	63.40	61.20	
<b>Gesamtsumme</b>	126.45	126.45	126.45	126.45	126.45	126.45	126.45	126.45	126.45	126.45	126.45	126.45	
<b>Differenz</b>	126.45	13.65	1.45	-45.25	-19.35	38.95	-24.45	37.55	38.45	-4.05	-0.35	4.05	
<b>Effekt</b>	21.08	2.28	0.24	<b>-7.54</b>	-3.23	6.49	-4.08	6.26	6.41	-0.67	-0.06	0.68	

1. Effekte der Dummy-Variablen quadrieren und summieren:  $Y_{DV} = (6.41)^2 + (-0.67)^2 + (-0.06)^2 + (0.68)^2 = 41.98$
2. Berechnung der Varianz → durch die Anzahl der Dummy-Variablen dividieren ( $n = 4$ ):  $V_{eff} = 41.98 : 4 = 10.50$
3. Berechnung der Standardabweichung  $s_{eff}$  :  $s_{eff} = \sqrt{v_{eff}} = 3.24$
4. Minimum Significant Factor Effect (MIN) → Multiplikation der  $s_{eff}$  mit dem t-Wert ( $\alpha = 0.10, FG = 4$ )

**MIN =  $s_{eff} \cdot t = 6.91$**

BSA		Einflussfaktoren							Varianzen				
Versuchsnr.	Mittelwert	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RSD%
		Färbezeit	Entfärbezeit	Temp. Färbung	Temp. Lauf	Probenpuffer	Gelalter	Gel					
1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	9.3
2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	6.3
3	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	8.5
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	5.5
5	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	20.3
6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	14.0
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	5.6
8	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	11.4
9	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	14.3
10	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	12.0
11	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	5.6
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.3
<b>Summe +</b>	123.85	67.30	63.35	49.20	55.95	60.85	64.05	56.85	80.45	63.25	54.20	60.15	
<b>Summe -</b>	-----	56.55	60.50	74.65	67.90	63.00	59.80	67.00	43.40	60.60	69.65	63.70	
<b>Gesamtsumme</b>	123.85	123.85	123.85	123.85	123.85	123.85	123.85	123.85	123.85	123.85	123.85	123.85	
<b>Differenz</b>	123.85	10.75	2.85	-25.45	-11.95	-2.15	4.25	-10.15	37.05	2.65	-15.45	-3.55	
<b>Effekt</b>	20.64	1.79	0.47	-4.24	-1.99	-0.36	0.71	-1.69	6.18	0.44	-2.58	-0.59	

1. Effekte der Dummy-Variablen quadrieren und summieren:  $Y_{DV} = (6.18)^2 + (0.44)^2 + (-2.58)^2 + (-0.59)^2 = 45.31$
2. Berechnung der Varianz → durch die Anzahl der Dummy-Variablen dividieren ( $n = 4$ ):  $V_{eff} = 45.31 : 4 = 11.33$
3. Berechnung der Standardabweichung  $s_{eff}$  :  $s_{eff} = \sqrt{V_{eff}} = 3.37$
4. Minimum Significant Factor Effect (MIN) → Multiplikation der  $s_{eff}$  mit dem t-Wert ( $\alpha = 0.10$ ,  $FG = 4$ )

$$MIN = s_{eff} \cdot t = 7.17$$



# Plackett - Burman

---

- von Protein zu Protein werden unterschiedliche Effekte als signifikant angesehen
  - ∅ Keine allgemeine Aussage zu den Einflussfaktoren möglich
  - ∅ Keine allgemeine Optimierung der Gelelektrophorese über die Einflussfaktoren möglich
  - ∅ Optimierung nur bei bekannten Proteinen
    - è **Proteincharakterisierung**
    - è **Proteinklassifizierung**

# Schlussfolgerungen

---



- das Hintergrundsignal ist die wichtigste Fehlerquelle
- diese kann verringert werden durch die Detektion mittels eines NIR-Detektors oder mittels Nativer Fluoreszenz
- eine RSD% von 5% ist in Reichweite
- Plackett – Burman – Versuchsdesign:
  - keine allgemeine Optimierung für alle Proteine über die untersuchten Einflussfaktoren möglich

# Ausblick

---



- Proteinanalyse:
  - Zusammensetzung
  - Eigenschaften (z.B. Hydrophilie)
  - Form
  - Beweglichkeit
- Zusammenhang zwischen Proteineigenschaften und Einflussfaktor
- Klassifizierung der Proteine  
(welche Proteingruppe reagiert auf welche Faktoren?)

# Danksagung

---



- Dr. Lothar Jänsch  
HZI Braunschweig



- Prof. Dr. Edward S. Yeung, Hui Zhang  
Iowa State University

IOWA STATE UNIVERSITY

- Prof. Dr. Aftab Ahmed  
University of Rhode Island



- Prof. Dr. K.-H. Gericke, Andreas Schenk  
Institut für Physikalische und Technische Chemie,  
TU Braunschweig

**Vielen Dank  
für Ihr  
Interesse!**

# Elektrophorese zur Analyse von Proteinen: Präzision und Leistungsfähigkeit



Simone Schröder, Hermann Wätzig  
Institut für Pharmazeutische Chemie  
TU Braunschweig