

Untersuchungen zur Trennung von bovinem Lactoferrin durch Affinitätschromatographie

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Anne Scholz

Hamburg-Bergedorf

am 26. Oktober 2010

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Birger Anspach

Prof. Dr. phil. nat. Oliver Ullrich

Die Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für Bioverfahrenstechnik an der Fakultät Life Sciences, Department Biotechnologie der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem im Ausgabeantrag formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Anne Scholz

Hamburg, den 26.10.2010

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei meinem betreuenden Professor Dr. Birger Anspach für die Möglichkeit bedanken, die Bachelorarbeit an der HAW Hamburg durchzuführen und somit ein weiteres Aufgabenfeld der Biotechnologie näher kennen gelernt zu haben. Er stand mir während der Ausarbeitung hilfreich und geduldig zur Seite.

Prof. Dr. Oliver Ullrich danke ich für seine Bereitschaft sich als zweiter Gutachter zur Verfügung zu stellen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium finanziell ermöglicht haben und ebenso wie Ina immer großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben.

Zwei weitere Personen dürfen hier auf gar keinen Fall fehlen: Sarah und Dominik, ihr habt mir während des gesamten Studiums und insbesondere in der letzten Zeit so liebevoll und moralisch unterstützend zur Seite gestanden. Dafür danke ich euch ganz besonders.

Schließlich möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Freund Robert für seine Liebe und Unterstützung während der Studienzeit bedanken.

Inhalt

1. Einleitung	6
2. Theoretische Grundlagen	7
2.1 Lactoferrin	7
2.1.1 Struktur, Vorkommen, Eigenschaften	7
2.1.2 Aufreinigung von Lactoferrin	9
2.2 Affinitätschromatographie.....	10
2.2.1 Farbstoff Cibracon Blue F3G-A.....	12
2.3 Größenausschlusschromatographie	14
2.4 SDS-PAGE	15
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Material.....	17
3.1.1 Verwendete Chemikalien	17
3.1.2 Geräte.....	18
3.1.3 Materialien.....	19
3.2 Methoden.....	19
3.2.1 Probenaufbereitung	19
3.2.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung.....	21
3.2.2.1 Pufferlösungen	21
3.2.2.2 Voruntersuchungen zum Elutionsverhalten von Lactoferrin	23
3.2.2.3 Variation des Vorlagepuffers	24
3.2.2.4 Elutionsverhalten von Lactoferrin in Molke	25
3.3.3 Größenausschlusschromatographie	26
3.3.4 SDS-PAGE	27
3.3.4.1 Markerproteine	27
3.3.4.2 Herstellung von Tris/HCl-Gelen für die SDS-PAGE	28
3.3.4.3 Durchführung der Gelelektrophorese mit Tris/HCl-Gelen.....	29
3.3.4.4 Färben und Entfärben der Tris/HCl-Gele.....	31
4. Ergebnisse und Diskussion	32

4.1 Vorversuche: potentielle Elutionsmittel.....	32
4.2 Elution von Lactoferrin in Molke	34
4.3 Entsalzung.....	35
4.4 Analytische Untersuchung mittels SDS-PAGE	35
4.5 Vergleich und Bewertung der Ergebnisse	40
5. Literatur	42
6. Anhang.....	45
6.1 Affinitätschromatographische Chromatogramme.....	45
6.2 Desalting-Chromatogramme	64

1. Einleitung

Lactoferrin ist ein Bestandteil von Molke, welche in großen Mengen in der Käseherstellung anfällt. Aufgrund seiner vielen biologischen Vorteile, wäre es günstig dieses Protein über geeignete Methoden zu isolieren. Bisher wird es aus Sauer- und Süßmolke durch Ionenaustauschchromatographie in industriellem Maßstab extrahiert (Tomita, Wakabayashi et al., 2002). Eine bessere Aufreinigung ist allerdings mittels Affinitätschromatographie, aufgrund dessen hoher Selektivität, zu erwarten.

Es ist bekannt, dass humanes Lactoferrin bereits erfolgreich aus Colostrum mittels Affinitätschromatographie mit Cibracon Blue-Sephharose aufgereinigt werden konnte (Bezwozda, Mansoor, 1986). Bei Untersuchungen von bovinem Lactoferrin kann jedoch eine starke Adsorption an den Affinitätsträger festgestellt werden (Shimazaki, Nishio, 1991). Ziel dieser Arbeit ist es bereits publizierte Elutionsmethoden zu überprüfen und geeignete Elutionsmittel zu finden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Lactoferrin

2.1.1 Struktur, Vorkommen, Eigenschaften

Lactoferrin wurde erstmals 1939 aus Kuhmilch durch Sørensen und Sørensen als „rote Fraktion“ fraktioniert, konnte jedoch nicht weiter aufgereinigt werden. Erst in den Jahren 1960 und 1961 wurde es von Groves isoliert und als transferrin-ähnliches Glykoprotein definiert (Wakabayashi, Yamauchi, Takase, 2006). Die namensbestimmende Funktion besteht in der Bindung von Eisen. Allerdings hat dieses zur Familie der Transferrine zählende Protein noch viele weitere Eigenschaften und kann daher als multifunktional bezeichnet werden. So werden Lactoferrin antimikrobielle, entzündungshemmende, anti-tumorbildende und immunmodulatorische Eigenschaften (Brisson et al., 2007) zugeschrieben. Des Weiteren wirkt es antiviral und als Antioxidant. (González-Chávez et al., 2009)

Lactoferrin kommt in vielen externen Säugetiersekreten, z.B. Milch, Speichel, vaginalen und bronchialen Sekreten und in Granula von polymorphkernigen Neutrophilen vor (Grasselli, Cascone, 1996). Die weißen Blutkörperchen sind ein essentieller Teil des angeborenen Immunsystems, woraufhin Lactoferrin eine wichtige Rolle bei Abwehrreaktionen spielt. Es wird besonders in den Milchdrüsen von Säugetieren exprimiert, weshalb die höchste Konzentration in Milch zu finden ist. In boviner Milch liegen Konzentrationen von 0,02 bis 0,2 g/L vor. Am höchsten ist sie in Colostrum mit 1,5 g/L. (Steijns, van Hooijdonk, 2000) Des Weiteren ist Lactoferrin an der Regulation der Absorption von Eisen und anderen Metallen im Magen-Darm-Trakt beteiligt.

Das Protein besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa (Abe, Saito et al., 1991). Es besitzt 17 intramolekulare Disulfidbrücken und keine freien Cysteine. Die Struktur von Lactoferrin ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Bovines Lactoferrin besteht aus 689 Aminosäuren, die in zwei homologe globuläre Bereiche gefaltet sind. Entsprechend dem N-Terminus und dem C-Terminus spricht man von den sogenannten N- und C-lobe, diese wiederum sind jeweils in zwei Domänen unterteilt:

N1 und N2, C1 und C2. Über eine kurze α -Helix sind die beiden Bereiche miteinander verbunden. Diese ist entscheidend für die Öffnung oder Schließung der Domänen.

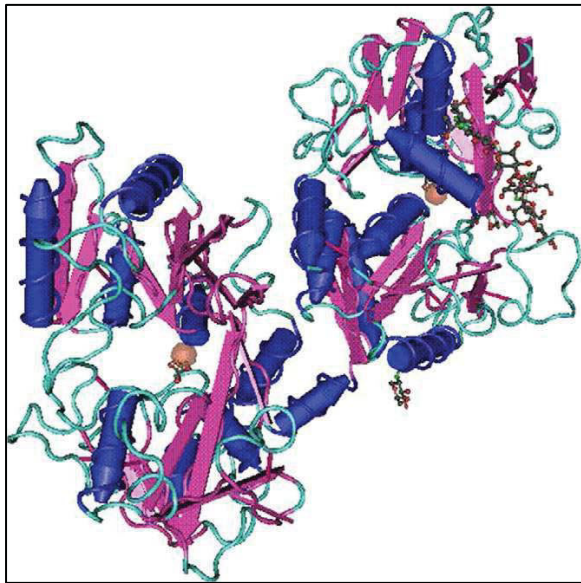


Abb. 2.1: Drei-dimensionale Struktur von bovinem Lactoferrin (González-Chávez et al., 2009)

Zwischen den jeweiligen Domänen eines Bereiches besteht eine Spalte, in die ein Eisen-Ion (Fe^{3+}) in Koordination mit einem Carbonat-Ion (CO_3^{2-}) reversibel binden kann. Als beteiligte Aminosäuren als Liganden sind Asp60, Tyr92, Tyr192 und His253 in der N-lobe und Asp395, Tyr433, Tyr526 und His595 in der C-lobe bekannt. (Steijns, Hooijdonk, 2000) Es bleibt also festzustellen, dass es zwei eisen-bindende Stellen pro Molekül gibt.

Hat Lactoferrin Eisen gebunden, wird es als Holo-Lactoferrin bezeichnet. Es ist thermisch stabiler, die Eisensättigung erhöht die Stabilität und verringert Aggregationen. Dahingegen ist die eisenfreie Apo-Form hitzesensitiver. (Brisson, Britten, Pouliot, 2007). Im Gegensatz dazu fanden Abe, Saito et al. (1991) heraus, dass Apo-Lactoferrin im Sauren hitzestabil ist: auch nach 5 Minuten bei 90°C bei pH 4 besteht die eisen-bindende Kapazität und antibakterielle Aktivität.

Die Angabe zum isoelektrischen Punkt von bovinem Lactoferrin ist in der Literatur nicht eindeutig. So ist beispielsweise bei Almécija et al. (2006) ein pI-Wert von 9 angegeben, dahingegen führt Abe et al. (1991) einen Wert von 8.0 ± 0.2 an.

2.1.2 Aufreinigung von Lactoferrin

Bovines Lactoferrin wurde schon durch eine Vielzahl an chromatographischen Verfahren aus Colostrum oder Molke isoliert.

Industriell werden bisher Ionenaustauscher verwendet (Tomita, Wakabayashi, 2002). Dabei wurden insbesondere Carboxymethyl-Kationenaustauscher untersucht (Yoshida, Xiyun, 1991; Yoshida, Wie et al., 2000; Wu, Xu, 2009). Die Aufreinigung kann jedoch auch über hydrophobe Interaktion (Yoshida 1989), Gelfiltration (Alwan-al-Mashikhi, Nakai, 1987), Adsorptive Membranchromatographie (Plate et al., 2006) oder Affinitätschromatographie (AC) erfolgen. Hierbei wurden verschiedene Systeme untersucht: Aminohexyl-AC (Houen et al., 1996), Heparin-AC (Ounis et al., 2008), IMAC (immobilisierte Metallionen AC) (Calvo, Batistaviera, 1994), magnetische Affinitätsseparation (Chen, Guo, Guan, Liu, 2007) und Farbstoff-AC.

In der Farbstoffaffinitätschromatographie werden vor allem Red HE-3B und Cibracon Blue F3-GA als Liganden genutzt.

Die ersten grundlegenden Erkenntnisse zum Elutionsverhalten beschrieben Shimazaki und Nishio (1991). Bei ihren Untersuchungen stellten sie fest, dass bovines Lactoferrin sehr stark an Cibracon Blue F3-GA bindet und nur mit 1 M Kaliumthiocyanat, 3 M Kaliumchlorid oder freiem Farbstoff eluiert werden konnte. Dahingegen war die Elution mit 8 M Harnstoff, 1% Trion X-100 und 75% Ethylenglykol nicht erfolgreich. Sie nutzten eine AF-Blue Toyopearl 650 ml-Säule (Cibracon Blue F3GA immobilisiertes Gel) und 0,05 M Tris-HCl pH 8.0 als Vorlagepuffer.

In der Arbeit von Grasselli und Cascone von 1996 wird berichtet, dass Lactoferrin bei einem pH von 9.0 mittelmäßig an Cibracon Blue F3-GA adsorbiert, im Vergleich zur Bindung an Red HE-3B bei pH 5.0 bzw. 7.0. Sie konnten das Protein mit 2 M NaCl bzw. 3 M KCl eluieren. Die Separationsversuche mit Natriumdithionit und Natriumnitrit scheiterten.

Schließlich beschreibt Wolman et al. 2007, dass bovines Lactoferrin an Red HE-3B immobilisiert an Sepharose 4B adsorbiert und mit 25% Ethylenglykol, 2 M NaCl in Adsorptionpuffer (50mM Natriumphosphat pH 7.0, 500mM NaCl) eluiert werden kann.

2.2 Affinitätschromatographie

Proteine können durch chromatographische Prozesse voneinander getrennt und aufgereinigt werden. Eine besondere Methode der Säulenflüssigkeitschromatographie stellt hierbei die Affinitätschromatographie (AC) dar. Aufgrund der biologischen Funktion oder der individuellen chemischen Struktur des Proteins erfolgt eine reversible Bindung des Zielproteins an einen spezifischen Liganden, der mit der stationären Phase verknüpft ist, wodurch eine Aufreinigung mit hoher Selektivität erreicht wird. Besonders vorteilhaft erscheint dies, wenn das Protein nur in geringer Konzentration in einem großen Volumen eines Probengemischs vorliegt oder eine spezifische Verunreinigung abgetrennt werden soll. Weitere Vorteile sind die hohe Auflösung und Kapazität. Des Weiteren wird das Zielprotein aufkonzentriert und kann gegebenenfalls in weiteren Schritten von Verunreinigungen in eine reine Form überführt werden. (GE Healthcare: Affinity Chromatography Handbook, 2007)

Die Grundlage stellt die spezifische Wechselwirkung des Zielmoleküls mit dem Liganden dar. Dies kann auf elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen zurück zu führen sein.

Es gelten dementsprechend bestimmte Anforderungen an den Liganden: er muss kovalent an die Matrix gebunden sein, gegebenenfalls über einen sogenannten Spacer, um sterische Hinderungen bei der Bindung des Zielmoleküls zu reduzieren; er muss biospezifisch sein; die spezifische Bindungsaffinität zum Zielmolekül muss erhalten bleiben und die Desorption muss möglich sein, d.h. die Bindung mit dem Zielprotein ist reversibel.

Im Allgemeinen erfolgt die Einteilung von Liganden in zwei Gruppen: monospezifische und gruppenspezifische Liganden. Erstere Wechselwirkungen sind beispielsweise bei Antikörpern und Antigenen vorzufinden. Die biospezifische Wechselwirkung erfolgt ausschließlich mit diesem Bindungspartner, wohingegen bei gruppenspezifischen Liganden ähnliche Proteine aus einer Klasse an die Affinitätsmatrix binden. Ein häufig angewandtes Beispiel sind Lektine. Sie reagieren als immobilisierte Liganden reversibel mit Glykoproteinen. (Lottspeich, Engels, 2006)

Es können zwei Elutionstypen unterschieden werden. Bei der spezifischen Elution wird eine konkurrierende Substanz hinzugegeben. Durch Verwendung eines kompetitiven Liganden oder Substrates wird das Zielmolekül verdrängt. Andererseits kann die Pufferzusammensetzung variiert werden und somit eine unspezifische Elution erfolgen. Beispielsweise wird der pH-Wert modifiziert, wodurch sich die Nettoladung des Proteins ändert, oder die Ionenstärke wird erhöht. In beiden Fällen liegt aufgrund von Konformationsänderungen eine reduzierte Affinität vor und die Elution erfolgt. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Zugabe von chaotropen Agenzien oder organischen Lösungsmitteln, die die Struktur des Proteins beeinflussen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass extreme Änderungen zu temporären oder permanenten Schäden wie Denaturation des Proteins führen können und die biologische Aktivität gegebenenfalls nicht mehr gegeben ist.

Generell erfolgt der chromatographische Prozess in fünf Schritten:

- 1) das Säulenmaterial wird äquilibriert
- 2) Adsorption: die Probe wird injiziert, unter den gegebenen Bedingungen kann das Zielprotein am Liganden binden und nicht gebundene Bestandteile werden mit der mobilen Phase eluiert
- 3) ein Waschschrift zur weiteren Entfernung von nicht-gebundenem Material
- 4) Desorption: spezifische oder unspezifische Elution des gebundenen Proteins
- 5) Regeneration der Matrix.

Dadurch ergibt sich folgendes typisches Chromatogramm:

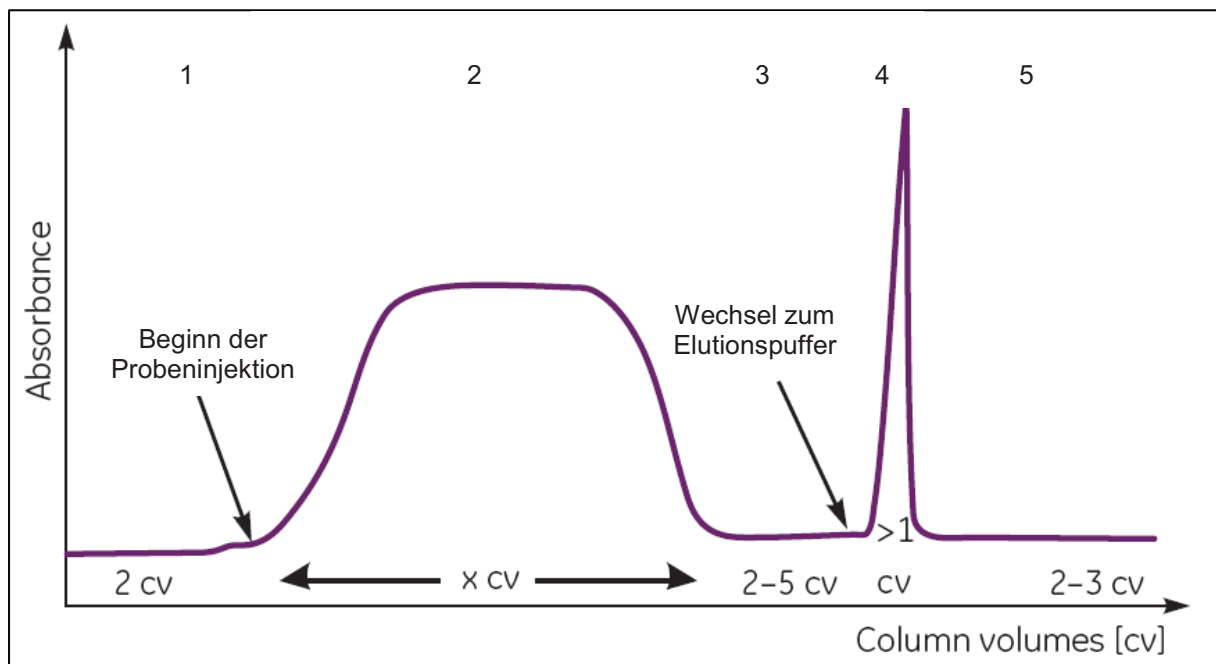


Abb. 2.1: Chromatogramm einer typischen Affinitätschromatographie, nach dem Äquilibrieren (1) folgt die Probeninjektion (2) bei der das Zielmolekül am Liganden adsorbiert und nicht gebundene Bestandteile eluieren, nach einem Waschschrift (3) wird das Zielprotein eluiert (4) und die Matrix regeneriert (5) (modifiziert nach: Affinity chromatography columns and media, Selection Guide, GE Healthcare, 02/2009)

2.2.1 Farbstoff Cibracon Blue F3G-A

Cibracon Blue F3G-A ist ein synthetischer polycyclischer Farbstoff, der als aromatischer anionischer Ligand bestimmte Proteine durch elektrostatische und/oder hydrophobe Wechselwirkungen bindet (GE Healthcare: Affinity Chromatography Handbook, 2002).

Als gruppenspezifischer Ligand zeigt der Farbstoff gewisse strukturelle Ähnlichkeiten mit den Nukleotid-Cofaktoren NAD^+ und NADP^+ . Er besitzt daher eine Affinität zu einer Vielzahl von Proteinen und Enzymen wie Kinasen, Dehydrogenasen und Enzymen, die Adenyl-haltige Cofaktoren benötigen. Im Datenblatt von GE Healthcare der Säule HiTrap Blue HP werden Albumin, Interferon, α_2 -Macroglobulin, Gerinnungsfaktoren, Enzyme, die Nukleotide benötigen und Proteine, die Nukleinsäuren binden als beispielhafte Substanzen genannt, die durch den Einsatz dieses Säulenmaterials isoliert und aufgereinigt werden können. Entweder aufgrund der Biospezifität durch die Ähnlichkeit mit den Nukleotid-Cofaktoren oder durch die weniger spezifischen Wechselwirkungen elektrostatischer bzw. hydrophober Natur.

Der Farbstoff ist mit Sepharose verlinkt, wie in Abb. 2.2 zu sehen, und liegt als stationäre Phase in der verwendeten Chromatographie-Säule HiTrap Blue HP von GE-Healthcare vor. Durch den Triazin-Teil des Farbstoffmoleküls ist es kovalent an das hochvernetzte Agarosemedium gebunden.

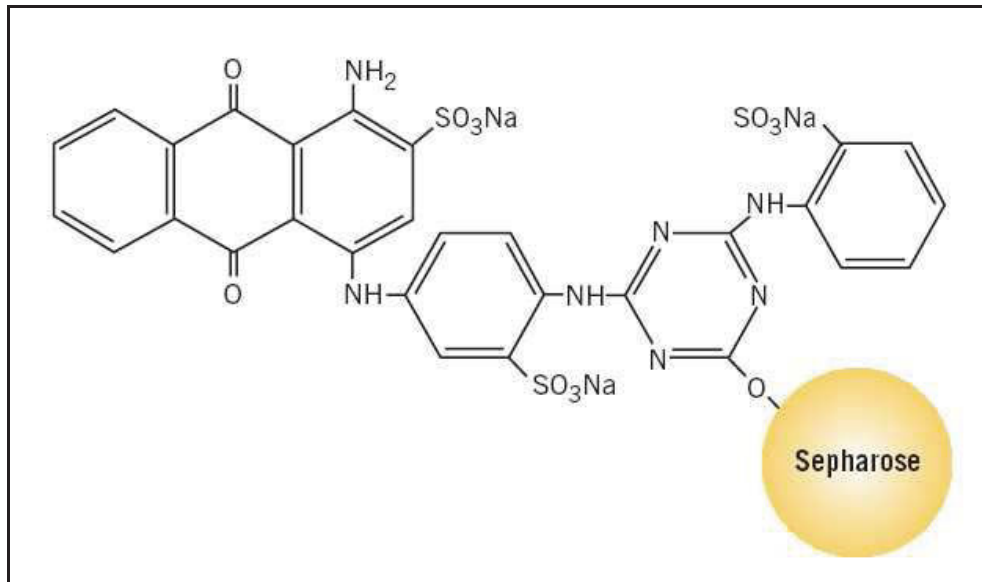


Abb. 2.2: Ausschnitt aus der Struktur der stationären Phase der Säule HiTrap Blue HP: der Farbstoff Cibacon Blue F3G-A ist an Sepharose-Beads verlinkt und dient als Ligand für affinitätschromatographische Aufreinigung (aus GE Healthcare Affinity Chromatography Handbook, 2007)

Sepharose ist die Matrix, an die der Ligand immobilisiert wird. Es handelt sich um eine quervernetzte Struktur von Agarose, die als Beads vorliegt. Durch die kugelförmige Struktur entsteht eine große Oberfläche, an die der Ligand kovalent und daran das Zielprotein reversibel gebunden werden kann. Dies wird durch eine hohe Porosität noch erhöht.

Laut Herstellerangaben ist der Vernetzungsgrad von Blue Sepharose High Performance 6%, die Partikelgröße ist durchschnittlich 34 μm . Als Substitutionsgrad werden etwa 4 mg Cibacon Blue F3G-A je mL Medium angegeben, wobei eine Bindungskapazität von 20 mg humanem Albumin ermittelt worden ist.

Die Matrix sollte chemisch und physikalisch inert sein. Des Weiteren ist sie über weite Bereiche stabil, d.h. auch bei der Anwendung von extremen pH-Werten oder Detergenzien verändert sie sich nicht bzw. durch den hohen Vernetzungsgrad ist sie so stabil, dass sie auch bei höheren Flussraten eingesetzt werden kann. Das Säulenmaterial der HiTrap

Blue HP ist über einen pH-Bereich von 4 bis 12 bei maximalen Flussraten von 4 mL/min und Gegendrücken bis zu 3 bar einsetzbar. Dabei soll es auch in hohen Salzkonzentrationen von 8 M Harnstoff und 6 M Guanidin-HCl chemisch stabil sein. (GE Healthcare Data File HiTrap Blue HP, 2006)

Triazin-Farbstoffe bieten in der Affinitätschromatographie als bekannter Matrixtyp gewisse Vorteile: so sind sie günstig, leicht erhältlich und leicht zu immobilisieren. Des Weiteren besitzen sie eine hohe Kapazität und sind resistent gegenüber biologischem und chemischem Abbau (Grasselli, Cascone 1996).

2.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie, die auch als SEC (size exclusion chromatography) oder Gelfiltration bezeichnet wird, wird zur Trennung von Molekülen aufgrund ihrer Größe verwendet.

Mit der SEC können niedermolekulare Bestandteile abgetrennt werden und somit Proben entsalzt und umgepuffert werden. Neben dieser Gruppentrennung können auch Fraktionierungen und Größenbestimmungen mittels der SEC vorgenommen werden.

Als Grundlage dient eine poröse Matrix. Diese besteht aus hochvernetzten Dextran- oder Agarose-Kügelchen einer definierten Partikelgrößenverteilung. Die Beads liegen als Trenngel in der Säule vor. Nachdem die Probe aufgegeben wurde, wandern die Moleküle durch die Säule und diffundieren dabei mehr oder weniger stark in die Poren hinein. Kleine Moleküle gelangen in die Poren und werden retardiert, wohingegen größere Moleküle nicht in die Partikel eindringen können und mit dem Puffer zuerst von der Säule eluiert werden (GE Healthcare Gel Filtration Handbook, 2007).

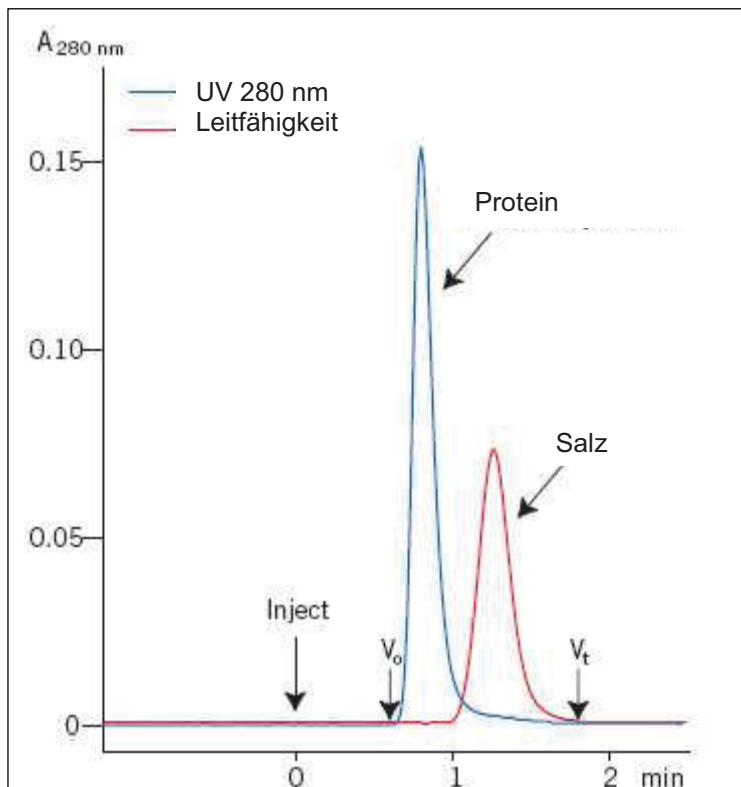


Abb.2.3: typisches Chromatogramm einer Gruppenseparation, größere Moleküle (Proteine) eluieren in oder kurz nach V_0 , kleinere Substanzen retardieren und werden innerhalb eines Säulenvolumens V_t eluiert (modifiziert nach GE Healthcare Gel Filtration Handbook, 2007)

Bestimmende Parameter für die Selektivität sind die Auswahl des Trenngels mit der definierten Porengröße, das Lösungsmittel, der pH-Wert und das Verhältnis von Probenvolumen zur Säulendimension. Zusätzlich können durch Variation der Flussrate bessere Trennergebnisse erzielt werden. Hierbei bringt der Einsatz einer geringeren Flussrate eine bessere Auflösung. (Lottspeich, Engels, 2006)

2.4 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die zur Trennung von Proteinen eingesetzt wird.

Bei der Probenvorbereitung verlieren die Proben durch die Behandlung mit dem Detergens SDS ihre Eigenladung und werden bei 95°C denaturiert. Es liegen reduzierende Bedingungen vor, d.h. durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken aufgespalten, wodurch die Tertiärstruktur aufgelöst wird und das Protein linear vorliegt.

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes erfolgt die Auftrennung der Proteine nun ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht. Die Moleküle wandern mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch das Polyacrylamidgel, es entstehen typische Banden.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese durchlaufen die Proteine zunächst das weitporige Sammelgel, in dem sie aufkonzentriert werden, ehe sie im engporigen Trenngel aufgetrennt werden. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des 12%-igen Trenngels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern.

Im Anschluss erfolgt eine Coomassiefärbung, um die aufgetrennten Moleküle zu visualisieren.

Das apparente Molekulargewicht von Lactoferrin ist laut Hurley et al. (1993) abhängig von der Herkunft. So ist Lactoferrin aus Brustgewebe 83-87 kDa und solches aus Milch-Neutrophilen 87-91 kDa groß, wobei der Glykolysierungsgrad jeweils unterschiedlich ist.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Art.-Nr.
a-Chymotrypsinogen A from bovine pancreas, Type II	Sigma-Aldrich, Steinheim	C4879
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	M7154
Albumin Fraction V (BSA)	ROTH, Karlsruhe	8076.2
Albumin from chicken egg white (Ovalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim	A5503
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg	13375
Ammoniumsulfat	ROTH, Karlsruhe	3746.3
Boric Acid (Borsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim	B7660
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim	B8026
Calciumchlorid Dihydrat	ROTH, Karlsruhe	5239.1
Ethylenglycol	ROTH, Karlsruhe	9516.1
Glycin	ROTH, Karlsruhe	T873.1
Glycerin	ROTH, Karlsruhe	7530.1
Guanidin-HCl	ROTH, Karlsruhe	0037.1
Kaliumchlorid	ROTH, Karlsruhe	6781.1
Kaliumthiocyanat	ROTH, Karlsruhe	P753.1
Lactoferrin from bovine colostrum	Sigma-Aldrich, Steinheim	L4765
Lysozym	Merck, Darmstadt	1.05281
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe	3957.3
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe	9265.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Riedel-de Haën, Seelze	62862
Natriumhydrogencarbonat	ROTH, Karlsruhe	6885.2
Natriumhydroxid	ROTH, Karlsruhe	6771.1
pH-Kalibrierlösung pH 4.01 HI 7004	ROTH, Karlsruhe	H906.1
pH-Kalibrierlösung pH 7.01 HI 7007	ROTH, Karlsruhe	H908.1
Ribonuclease A	ROTH, Karlsruhe	7156.1

Roti-Blue 5X – Konzentrat	ROTH, Karlsruhe	A152.1
Rotiphorese Gel 30 (30 %ige Acrylamid-, Bisacrylamid-Lösung im Verhältnis 37,5 : 1)	ROTH, Karlsruhe	3029.1
Rotisol (99% Ethanol)	ROTH, Karlsruhe	7917.2
Salzsäure	ROTH, Karlsruhe	6331.1
TEMED	Merck, Darmstadt	1.10732
Tris	ROTH, Karlsruhe	AE15.2
Triton X-100	ROTH, Karlsruhe	3051.2
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim	U6504

3.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Analysenwaage	Sartorius	BP 221 S
Elektrophorese-System	Bio-Rad	Mini-PROTEAN Tetra Cell System
FPLC	Bio-Rad	BioLogic DuoFlow, mit BioLogic DuoFlow Software 4.0
Folienschweißgerät	Severin	Typ 3600
Fraktionssammler	Bio-Rad	BioLogic BioFrac Collector
Heizblock	Roth	Test Tube Thermostat TCR 100
Kühlschrank-Tiefkühler	Liebherr	
Kühlzentrifuge	Sigma	Laborzentrifuge 3 K 10
Magnetrührer mit Heizfunktion	IKA Werke	IKAMAG RCT basic
Magnetrührer	Heidolph	MR 1000
Microzentrifuge	Sartorius Stedim	Centrisart A-14
Oberschalenwaage	Sartorius	BP 8100
pH-Meter	Knick	761 Calimatic
Power Supply	Pharmacia Biotech	EPS 200
Peristaltische Pumpe	Pharmacia	LKB Pump P-1
Scanner	Canon	CanoScan 4200F, mit Software AcrSoft PhotoStudio 5
Vakuumpumpe	Leybold	Divac 2.4L

Vortexer	IKA Labortechnik	VF2
Vortexer	VWR	Vortex 1719
Wippschüttler	Assistent	348/1

3.1.3 Materialien

Material	Hersteller	Art.-Nr.
Faltenfilter(Rotilabo), 100% Cellulose	ROTH, Karlsruhe	CA21.1
HiTrap Blue HP (Affinitätschromatographie-Säule)	GE Healthcare, Uppsala	17-0412-01
HiTrap Desalting (Entsalzungs-Säule)	GE Healthcare, Uppsala	17-1408-01
Membranfilter, Nitrocellulose, 0,45 µm	GE Water & Process Technologies, Trevose	E04WG047S1
Spritze, 50 ml	Terumo, Leuven	BS-50LG
Spritze, 20 ml	B.Braun, Melsungen	4606205V
Spritzenfilter (Rotilabo), 0,45 µm	ROTH, Karlsruhe	KH55.1
Superloop 50 ml	GE Healthcare, Uppsala	18-1113-82

3.2 Methoden

3.2.1 Probenaufbereitung

Für die Voruntersuchungen wurde 90%-iges aufgereinigtes bovines Lactoferrin der Firma Sigma verwendet. Das Protein wurde in Vorlagepuffer (siehe Tabelle 3.2) mit einer Konzentration von 100 µg/ml gelöst und bis zur chromatographischen Untersuchung bei 4°C im Kühlschrank in PP-Weithalsflaschen gelagert. Die Konzentrationsangabe richtet sich hierbei nach dem annähernd natürlichem Gehalt von boviner Milch mit $101,43 \pm 45,48$ µg/mL (Cheng, Wang et al., 2008)

Als Probenmaterial wurde Sauermolke der Firma Campina verwendet. In Tabelle 3.1 sind die natürlichen Inhaltsstoffe angegeben.

Tabelle 3.1: Inhaltsstoffe der verwendeten Sauermolke

Bezeichnung	Strothmann Reine Molke
Hersteller	Campina
Kalorien- und Nährwertangaben beziehen sich auf 100 g	
Kalorien (kcal)	21
Eiweiß	0,6 g
Kohlenhydrate	4,2 g
Fett	0,1 g

Um das restliche Fett zu entfernen wurde die auch von Grasselli und Cascone (1996) beschriebene thermische Präzipitation mit Calcium (Ca^{2+}) angewandt: Zunächst wurden 0,12 g CaCl_2 langsam in 100 mL Molke eingerührt, die in einem Eisbad gekühlt in einem Becherglas vorliegt. Daraufhin wurde die Suspension von einem pH-Wert von pH 4,49 mit 2 M NaOH auf pH 7,4 titriert. Die Erwärmung der Suspension erfolgte für 8 Minuten in einem Wasserbad auf 50-55°C. Nach der Abkühlung auf Eis wurde die Molke auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt, diese ausgewogen und schließlich bei 2501 x g für 8 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Es bildeten sich etwa 5 mL weißes gelartiges Pellet und 85 mL hell-gelblicher klarer Überstand, welcher abschließend durch einen 0,45 μm Spritzenfilter filtriert und im Kühlschrank bis zur chromatographischen Aufreinigung gelagert wurde. Laut Rombaut und Dewettinck (2007) werden durch die Kombination von Calciumzugabe, pH-Anstieg und thermischer Behandlung Lipoproteine, restliche Fettkügelchen und Fragmente der Milchfettkügelchenmembran in Calciumphosphat eingeschlossen, wodurch eine Klärung der Molke erfolgt. Dabei sollen die initiale Calciumkonzentration von 0,12 g/kg und die finale Temperatur von 50°C die bestimmenden Faktoren für die Aggregatbildung sein, wohingegen die Anfangstemperatur von 2°C und der pH-Wert unbedeutender seien.

Da Lactoferrin in Molke nur in sehr geringer Konzentration vorkommt, wurde das auch für die Vorversuche verwendete, bereits aufgereinigte bovine Lactoferrin von Sigma mit 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ versetzt.

3.2.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung

Die chromatographische Aufreinigung von Lactoferrin erfolgte an der FPLC-Anlage Bio-Logic DuoFlow von Bio-Rad mit einer HiTrap Blue HP Affinitätschromatographie-Säule von GE-Healthcare. Der Farbstoff Cibracon Blue F3G-A ist kovalent an Blue Sepharose High Performance gebunden und dient als Ligand.

Das Säulenvolumen beträgt 1 mL. Es wurde jeweils mit der vom Hersteller empfohlenen Flussrate von 1 mL/min gearbeitet.

Zu Beginn jedes Versuches wurden die Schläuche mit dem jeweiligen Puffer manuell vorgespült, ehe das in der Software geschriebene Programm gestartet wurde.

Zu jeder Zeit kann die Leitfähigkeit und die UV-Absorption bei 280 nm detektiert werden.

Die Proben wurden mit Hilfe einer peristaltische Pumpe bei einem Volumen bis zu 5 mL in eine Probenschleife und für größere Probenvolumina in eine 50-mL-Super-Loop (GE Healthcare) gefüllt und anschließend durch Ausspülen mit Vorlagepuffer auf die Säule injiziert.

3.2.2.1 Pufferlösungen

Zum Ansetzen der Pufferlösungen wurden die Substanzen jeweils eingewogen und in VE-Wasser bzw. Vorlagepuffer unter Rühren gelöst. In den Tabellen 3.2 und 3.3 sind die Mengen für je einen Liter Ansatz angegeben, tatsächlich wurden die Volumina gegebenenfalls angepasst. Insofern es notwendig war, wurde der pH-Wert mit 1 M NaOH bzw. 25% HCl eingestellt. Alle Puffer wurden vor dem Einsatz an der FPLC-Anlage durch eine Vakuumpumpe über einen 0,45 µm Nitrocellulosefilter filtriert und entgast. Die Puffer wurden alle bei Raumtemperatur gelagert.

Die als Vorlagepuffer bezeichneten Lösungen stellen Puffer dar, die zum Äquilibrieren des Säulenmaterials, zur Probenaufgabe und zum Waschen verwendet wurden. Dabei wurde auch der Effekt von verschiedenen pH-Werten untersucht. Die Auswahl der Puffersalze richtet sich entsprechend der Hendersen-Hasselbalch-Gleichung, $\text{pH} = \text{pK}_s + \log \frac{c(\text{A}^-)}{c(\text{HA})}$,

nach ihren pK_s-Werten. Damit die Puffer wirksam sind, d.h. die schwache Säure und die korrespondierende Base in annähernd äquimolaren Mengen vorliegen, müssen die pK_s-Werte der verschiedenen Puffersalze möglichst nah am erwünschten pH-Wert liegen. So ist der pK_s von Tris-HCl 8,30, der von Borsäure 9,24 und der von Natriumhydrogencarbonatpuffer 10,33.

Tabelle 3.2: angesetzte Lösungen

Name	Substanz	Stoffmengenkonz. c [mol/L]	Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]
NaOH	NaOH	1	39,997	39,997
Vorlagepuffer 1 – Tris-HCl pH 8.0	Tris	0,05	121,14	6,057
Vorlagepuffer 2 – Borsäure pH 9.0	Boric Acid	0,02	61,83	1,2366
Vorlagepuffer 3 – Natriumhydrogencarbonat pH 10.0	NaHCO ₃	0,02	84,01	1,6802

Als potentielle Elutionsmittel werden zunächst die in Literaturquellen angegebene Elutionsmittel ausgetestet und deren Wirksamkeit nun überprüft bzw. neue Substanzen in anderen Konzentrationsbereichen eingesetzt. Dabei wurden sowohl ionische als auch chaotrope Agenzien verwendet, wodurch wahrscheinlich Rückschlüsse auf die Wechselwirkung von Lactoferrin mit dem Farbstoff Cibracon Blue F3G-A möglich sind.

Tabelle 3.3: ausgetestete Elutionsmittel, angesetzt in Vorlagepuffer

	Substanz	Konzentration		Molare Masse	Einwaage	Volumen
		c [mol/L]	σ [% (v/v)]	M [g/mol]	m [g]	V [mL]
E1	KCl	3	-	74,55	223,65	-
E2	NaCl	2	-	58,44	116,88	-
E3	Urea	2	-	60,06	120,12	-
E4	Guanidin-HCl	2	-	95,53	191,06	-
E5	Kaliumthiocyanat	1	-	97,18	97,18	-
E6	Kaliumthiocyanat	2	-	97,18	194,36	-
E7	Triton X-100	-	1	624	10,67 ¹⁾	(10)
E8	Ethanol ²⁾	-	60	46,07	-	600
E9	Ethylenglykol ²⁾	-	75	62,07	-	750
E10	Ethylenglykol ²⁾	-	25	62,07	-	250
E11	Ethylenglykol	-	25	62,07	-	250
	KCl	3	-	74,55	223,65	-
E12	Ethylenglykol	-	25	62,07	-	250
	NaCl	2	-	58,44	116,88	-

¹⁾ berechnet über die Dichte: $\rho_{\text{Triton X-100}} = 1,067 \text{ g/cm}^3$

²⁾ angesetzt in VE-Wasser

3.2.2.2 Voruntersuchungen zum Elutionsverhalten von Lactoferrin

Zunächst wurde überprüft, ob Lactoferrin wie in der Literatur beschrieben bei 280 nm detektierbar ist. Dazu wurde die Probelösung für die Voruntersuchungen (100 $\mu\text{g/mL}$ 90% reines Lactoferrin in Vorlagepuffer 1) sowohl über die Pumpe als auch über die 5 mL-Schleife in das System injiziert. Dabei war noch keine HiTrap Blue HP –Säule eingebaut, so dass tatsächlich 500 μg Protein am UV-Detektor ein Signal verursachten.

Es folgte eine Reihe von Chromatographieläufen mit den in Tabelle 3.3 angegebenen Elutionsmitteln. Die Fließmittelgeschwindigkeit betrug immer 1 mL/min. Bevor das Pro-

gramm gestartet wurde, wurden alle Schläuche mit den jeweiligen Puffern gespült und die Probe über die peristaltische Pumpe in die Probenschleife eingesogen.

Alle 12 Verbindungen durchliefen folgendes Programm:

- Äquilibration der Säule mit 5 CV Vorlagepuffer (isokratisch)
- UV Zero Baseline: das UV-Signal wird auf Null gesetzt, somit sind alle folgenden Schritte miteinander vergleichbar und der Start der Probenaufgabe ist eindeutig zu erkennen
- Injektion von 5 mL Probe aus der Probenschleife
- Waschen mit 2 CV Vorlagepuffer (isokratisch)
- Start der Elution durch Linearen Gradienten über 5 CV
- 5 CV lang Halten von 100% Elutionsmittel
- Re-Äquilibration mit 100% Vorlagepuffer über 6 CV (isokratisch)

Um tatsächlich eine Aussage zu treffen, ob Lactoferrin eluiert werden konnte, musste vor dem eigentlichen Probenlauf immer ein Leergradient als Vergleich durchgeführt werden. Dazu wurde die Probenschleife mit Vorlagepuffer 1 gefüllt und das Programm so durchlaufen.

Da erwartungsgemäß nicht alle Elutionsmittel taugten, wurde nach jedem Paar von Leer- und Probenlauf die Säule mit 1 M NaOH regeneriert. Dabei wurde die Säule mit 5 CV Vorlagepuffer gespült, ein linearer Gradient zu 1 M NaOH über 5 CV aufgebaut, die Lauge 5 CV lang weiter gespült und schließlich wieder 5 CV mit Vorlagepuffer neutralisiert.

3.2.2.3 Variation des Vorlagepuffers

Da der Farbstoff Cibracon Blue F3-GA neben seiner Eigenschaft affinitätschromatographischer Ligand zu sein, auch als Ionenaustauscher wirkt, wird der pH-Wert der Vorlagepuffer variiert um eventuelle Effekte zu beobachten. 20 mM Borsäure mit pH 9.0 und 20 mM Natriumhydrogencarbonatpuffer mit pH 10.0 werden als Vorlagepuffer eingesetzt. Da die pH-Werte höher als der pI von Lactoferrin sind, ist das Protein überwiegend positiv geladen und kann als Kation durch ein Puffersalz ausgetauscht werden.

Die Durchführung erfolgt analog zur Verwendung von Vorlagepuffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0) wie unter 3.2.2.2 beschrieben.

3.2.2.4 Elutionsverhalten von Lactoferrin in Molke

Nachdem Guanidin-HCl und Kaliumthiocyanat mit einer Konzentration von je 2 M als potentielle Elutionsmittel ausgemacht werden konnten, wurden diese beiden Systeme auf eine reale Probe übertragen.

Fürs Erste wurde die aufgearbeitete Molke ohne Lactoferrin-Zusatz appliziert. Zusätzlich zum linearen Gradienten mit dem Elutionsmittel für Lactoferrin, wurde ein weiterer Gradient eingefügt. Nach der Probenaufgabe wird ein Salzgradient mit 2 M NaCl in Vorlagepuffer gefahren, um andere Molkenproteine vor der eigentlichen Elution von der Säule zu entfernen. Somit ergibt sich folgendes Programm für die affinitätschromatographische Aufreinigung von Molke:

- Äquilibration der Säule mit 5 CV Vorlagepuffer (isokratisch)
- UV Zero Baseline
- Injektion von 5 mL Probe aus der Probenschleife
- Waschen mit 5 CV Vorlagepuffer (isokratisch)
- Linearer Gradient auf 2 M NaCl über 5 CV
- isokratischer Fluss mit 2 M NaCl über 5 CV
- Waschen mit 5 CV Vorlagepuffer
- UV Zero Baseline
- Start der Elution durch Linearen Gradienten über 5 CV
- 5 CV lang Halten von 100% Elutionsmittel
- Re-Äquilibration mit 100% Vorlagepuffer über 5 CV (isokratisch)
- UV Zero Baseline
- Linearer Gradient auf 1 M NaOH über 5 CV
- isokratischer Fluss mit 1 M NaOH über 5 CV
- Isokratischer Fluss mit Vorlagepuffer über 5 CV

Die Regeneration mit 1 M NaOH wurde optional durchgeführt.

Das Protokoll ändert sich nicht für die Untersuchung von Molke versetzt mit Lactoferrin.

Insofern die Elution unter den gegebenen Bedingungen erfolgreich war, kann der Probenlauf wiederholt werden und 1 mL –Fraktionen in den Bereichen gesammelt werden, in denen Proteine am Säulenausgang ankommen, d.h. bei der Probenaufgabe, der Vorelution mit Salz und der Elution. Die Fraktionen werden gegebenenfalls gepoolt und bei -20°C bis zur Entsalzung gelagert.

3.3.3 Größenausschlusschromatographie

Da die Elution von der affinitätschromatographischen Säule in hohen Salzkonzentrationen erfolgte, müssen im Anschluss eine Entsalzung der fraktionierten Proben und gleichzeitig eine Umpufferung erfolgen. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie kann eine Gruppenseparation vorgenommen werden: die Probenbestandteile werden aufgrund ihrer großen Unterschiede in den Molekulargewichten in eine Protein- und eine niedermolekulare Salzfraktion getrennt. Dabei werden die Proteine von den Partikeln des Säulenmaterials ausgeschlossen und werden im neuen Puffer als mobile Phase zuerst eluiert, wohingegen die Salze in die Poren der Partikel eindringen können und retardiert werden. Nachvollziehbar ist die Trennung durch Detektion des UV-Signals, das bei der Proteinfraktion stark ansteigt, und der Leitfähigkeit, dessen Peak durch die erhöhte Salzkonzentration folgt.

Das Trenngel der vorgepackte HiTrap Desalting Säule der Firma GE Healthcare ist Sephadex G-25 Superfine. Die Bead-Größe beträgt 15 bis 70 µm. Die Ausschlussgrenzen liegen bei M_r 1000 bzw. M_r 5000. Das Säulenvolumen (CV) beträgt 5 mL, die Säule kann mit Flussraten bis zu 10 mL/min betrieben werden. Es gilt, dass etwa 30% des Säulenvolumens als Probevolumen injiziert werden können um eine optimale Trennung zu erreichen. Dies liegt an der kurzen, breiten Form der Säule.

Die Desalting Säule wurde in die BioLogic Duo Flow – Anlage von Bio-Rad eingebaut.

Nach ersten Tests, bei denen die teilweise gepoolten Proben sowohl über eine 1 mL Luerlock-Spritze als auch eine 5 mL-Schleife injiziert wurden, zeigte sich, dass ein kleineres Probevolumen von 1 mL über eine Schleife bessere Resultate liefern würde. Des Weiteren

konnte festgestellt werden, dass eine Verringerung der Fließmittelgeschwindigkeit von 2,5 mL/min auf 1 mL/min eine wesentlich bessere Trennung der Proteine vom Salzpeak brachte. Dabei wurde immer unter isokratischen Bedingungen gearbeitet.

Als Elutionspuffer wurde Vorlagepuffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0) eingesetzt. Nach Äquilibrieren der Desalting-Säule mit einem Säulenvolumen (1 CV = 5 mL), wurde die Probe mit 3 mL definitiv aus der Schleife herausgespült und der Lauf nach Nachspülen mit zwei weiteren Säulenvolumen beendet. Nach den 2,6 CV war der Ursprungszustand wieder erreicht und die nächste Fraktionierung konnte injiziert und aufgetrennt werden. Abschließend wurde die Säule mit 20% Ethanol gespült und in diesem Lösungsmittel gelagert.

Die entsalzten Proben wurden in Fraktionen von 0,5 mL gesammelt und im Anschluss gepoolt. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20°C gelagert.

3.3.4 SDS-PAGE

3.3.4.1 Markerproteine

Zur Abschätzung der Molekulargewichte der Proteine in den Proben werden Standardproteine als Marker eingesetzt, von denen das Molekulargewicht bekannt ist und aus dessen Laufverhalten die Größe der unbekannt Proteine ermittelt werden kann.

Es wurde selbst ein Marker erstellt: die in Tabelle 3.3. angegebenen Proteine wurden jeweils mit einer Konzentration von 1 mg/mL in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung angesetzt und aus den Aliquots anschließend ein Proteingemisch hergestellt, indem je 100 µl Konzentrat vereinigt wurden.

Tabelle 3.3: Markerproteine

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Lactoferrin	~ 80
BSA	~ 66
Ovalbumin	~ 44,3
Chymotrypsinogen	~ 25,6
Lysozym	14,4
Ribonuclease A	13,7

3.3.4.2 Herstellung von Tris/HCl-Gelen für die SDS-PAGE

Es wurden Tris/HCl-Gele mit den Ausmaßen 8,3 x 7,3 x 0,75 cm nach Laemmli hergestellt. Das Gießen der Gele erfolgte in der Apparatur des Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems von Bio-Rad. Die Gelgießkammer für zwei Mini-Gele wurde aufgebaut und mit Ethanol auf ihre Dichtigkeit hin geprüft. Pro Tris/HCl-Gel wurden ein Trenn- und ein Sammelgel gegossen, die Chemikalien sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

In Tabelle 3.4 sind Angaben zu den angesetzten Lösungen zur Herstellung der Tris/HCl-Gele für die SDS-PAGE zu finden, wobei sich die hier angegebenen Einwaagen auf ein Ansatzvolumen von einem Liter beziehen.

Tabelle 3.4: Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung	Substanz	Konzentration		Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]
		c [mol/L]	β [% (w/v)]		
Tris-HCl pH 6.8	Tris	1	-	121,14	39,997
Tris-HCl pH 8.8	Tris	3	-	121,14	363,42
SDS ¹⁾	SDS	-	10	288,38	100
APS ²⁾	APS	-	10	228,20	100

¹⁾ SDS löst sich erst bei 68°C, daher beim Lösen erwärmen

²⁾ APS aliquotiert bei -20°C lagern

Tabelle 3.5: Verwendete Chemikalien für die Herstellung von 2 Trenn- und Sammelgelen

Trenngel (12% Acrylamid)		Sammelgel (5% Acrylamid)	
Volumen	Substanz	Volumen	Substanz
3,4 mL	VE-Wasser	5,7 mL	VE-Wasser
0,1 mL	10% SDS	0,1 mL	10% SDS
1,25 mL	3 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 mL	1 M Tris-HCl pH 6,8
4 mL	Rotiphorese Gel 30	1,7 mL	Rotiphorese Gel 30
5 μ L	TEMED	10 μ L	TEMED
65 μ L	10% APS (frisch aufgetaut)	65 μ L	10% APS (im Kühlschrank zwischengelagert)

Die einzelnen Chemikalien wurden in der Reihenfolge der Tabelle 3.5 in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und durch Schwenken miteinander vermischt, wobei nicht zu viel Luft eingetragen werden sollte. Das Trenngel wurde nach Zugabe von TEMED und APS, welche die Polymerisation auslösen, zügig in den Glas-Zwischenraum mit einem Spacer-Abstand von 0,75 mm bis etwa 1 cm unterhalb der Oberkante gegossen und mit VE-Wasser überschichtet. Nach Abnahme dieser luftabschließenden Schicht wurde das Sammelgel angesetzt und eingefüllt, wobei ein 10 well Kamm die Taschen für die Probenaufgabe formt. Nach jeweils etwa 35 Minuten waren die Gelschichten auspolymerisiert. Gegebenenfalls können die Tris/HCl-Gele im Kühlschrank, eingewickelt in feuchte Tücher in einem Plastikbeutel, bis zum Elektrophoreselauf kurzzeitig zwischengelagert werden.

3.3.4.3 Durchführung der Gelelektrophorese mit Tris/HCl-Gelen

Die Proben wurden vor dem Beladen aufbereitet. In Tabelle 3.6 ist die Herstellung von 50 mL des 2-fach konzentrierten Probenpuffers angegeben.

Tabelle 3.6: Verwendete Chemikalien für einen 2-fach konzentrierten Probenpuffer, Ansatzvolumen: 50 mL

Substanz	Massenkonzentration β [g/L]	Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]
Tris	12,114	121,14	0,6057
Glycerin	20 ³⁾	92,09	12,64 ⁴⁾
SDS	40	288,38	2
Bromphenolblau	0,2	691,94	0,01

³⁾ Angabe in Volumenprozent [% (v/v)]

⁴⁾ berechnet über die Dichte: $\rho_{\text{Glycerin}} = 1,264 \text{ g/cm}^3$

Die einzelnen Substanzen wurden in VE-Wasser gelöst und der pH-Wert mit 25% Salzsäure bzw. 1 M NaOH auf einen pH von 6.8 eingestellt. Abschließend wurden die 50 mL Probenpufferkonzentrat durch einen 0,45 μm Sterilfilter filtriert.

Für die Probenaufbereitung wird der Probenpuffer im Verhältnis 1:2 verdünnt und mit 2% β -Mercaptoethanol versetzt. Dazu wird ein Mastermix angesetzt: jeweils 25 μ L 2-fach Probenpufferkonzentrat, 1 μ L β -Mercaptoethanol und 24 μ L VE-Wasser werden pro Probe vorgelegt. Nach der Zugabe von 50 μ L Probenmaterial bzw. Marker, werden die Proben kurz anzentrifugiert, 5 Minuten bei 95°C im Thermoblock denaturiert und nochmals zentrifugiert um gebildetes Kondenswasser am Reaktionsgefäßdeckel zu entfernen.

Die gegossenen Gele werden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und ca. 1,5 L Laufpuffer (Herstellung siehe Tabelle 3.7) eingefüllt. Wird nur ein Gel genutzt, muss die innere Kammer durch den Buffer dam abgedichtet werden. Nachdem die Kämme herausgezogen wurden, wird die PowerSupply getestet. Die Auftrennung erfolgt bei 200 V und 160 mA.

Tabelle 3.7: Verwendete Chemikalien zur Herstellung des Laufpuffers (1-fach Konzentrat) Ansatzvolumen: 1 L

Substanz	Konzentration		Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]
	c [mol/L]	β [% (w/v)]		
Tris	0,025	-	121,14	3,0285
Glycin	0,192	-	75,07	14,4134
SDS	-	1	288,38	10

Es werden mit Hilfe des Sample Loading guides jeweils 15 μ L Probe (Überstand) bzw. Marker mit MultiFley-Gelbeladungs-Pipettenspitzen von ROTH in die Taschen geladen. Um die Lactoferrinbande eindeutig aus der Probe zu identifizieren, wird das Protein sowohl einzeln als auch im Marker in einer Spur zusätzlich aufgetragen. Nach ca. 45 bis 60 Minuten bei einer konstanten Spannung von 200 V wird die Trennung beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande als niedermolekulare Substanz das Trenngel fast (zwischen 0,3 – 0,5 cm von der Unterkante lokalisiert) durchlaufen hat.

3.3.4.4 Färben und Entfärben der Tris/HCl-Gele

Nach dem Gelelektrophoreselauf werden die Gele zweimal für etwa 5 Minuten in VE-Wasser gewaschen um die Salze und SDS zu entfernen und anschließend über Nacht in Färbelösung mit Coomassie auf dem Wippschüttler gefärbt.

Tabelle 3.8: Verwendete Chemikalien für das Färben der Gele

Substanz	Volumenkonzentration σ [% (v/v)]
Roti-Blue (5x)	20
Ethanol (Rotisol)	40

Die Entfärbung erfolgt in 25% (v/v) Ethanol für mindestens zweimal 30 Minuten auf dem Wippschüttler.

Die Tris/HCl-Gele werden in Folie mit etwas VE-Wasser eingeschweißt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Für die Auswertung werden sie mit Hilfe eines Scanners digitalisiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Vorversuche: potentielle Elutionsmittel

Im Anhang sind alle Chromatogramme der affinitätschromatographischen Vorversuche ersichtlich. Es ist jeweils ein guter Vergleich zwischen dem Leerlauf ohne Probenmaterial und dem Probenlauf erkennbar. Die Elutionsmittel zeigen insbesondere nach dem Gradienten einen Umschlagpeak, der auf die unterschiedlichen Salzgehalte zwischen dem Elutionspuffer und dem Vorlagepuffer zurückzuführen ist. Am UV-Detektor sind teilweise „Schlieren“ zu registrieren. Dieser typische Peak kommt dementsprechend sowohl im Leer- als auch im Probenlauf vor und kann daher als Proteinpeak ausgeschlossen werden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt. Dabei wird unterschieden, ob die Chromatogramme von Leer- und Probenlauf nahezu deckungsgleich sind und die Elution somit nicht erfolgreich war, ob eine kleine Veränderung im UV-Spektrum feststellbar ist, oder ob eine eindeutige Elution erfolgte, welche an einem zusätzlichen Proteinpeak im Linearen Gradienten zu erkennen ist.

Tabelle 4.1: Elutionsverhalten von Lactoferrin bei verschiedenen Lösungen,
- keine Elution, + leichte Elution, ++ sehr hohe Elution

Elutionsmittel	Elutionsverhalten
E1: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 M KCl	-
E2: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl	-
E3: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Urea	-
E4: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-HCl	++
E5: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M Kaliumthiocyanat	+
E6: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Kaliumthiocyanat	++
E7: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Triton X-100	-
E8: 60% Ethanol	-
E9: 75% Ethylenglykol	-
E10: 25% Ethylenglykol	-
E11: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25% Ethylenglykol, 3 M KCl	-
E12: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25% Ethylenglykol, 2 M NaCl	-
EV2: 20 mM Borsäure pH 9.0, 2 M Urea	-
EV3: 20 mM Natriumhydrogencarbonat pH 10.0, 2 M Urea	-

Die Ergebnisse von Shimazaki und Nishio (1991) können nur teilweise bestätigt werden. Erwartungsgemäß war die Elution mit 1% Trion X-100 und 75% Ethylenglykol nicht erfolgreich, wobei es bei Letzterem an einem zu hohen Druckanstieg im FPLC-System und somit einem Abbruch dieses Versuches lag. Das Ethylenglykol wurde daraufhin auf 25% verdünnt, konnte aber ebenso wie das weniger stark konzentrierte Urea –statt 8 M wurde eine 2-molare Lösung verwendet- das Lactoferrin nicht eluieren.

Die auch von Grasselli und Cascone (1996) verwendete 3 M Kaliumchloridlösung konnte ebenso wie die hochkonzentrierte Salzlösung von 2 M Natriumchlorid keine Elution herbeiführen.

Nur die Verwendung von Kaliumthiocyanat war wie in der Literatur angegeben beim Einsatz von 1 M von gewissem Erfolg. In den Abbildungen E-Ib und E-IIb ist der potentielle Elutionsbereich des Leerlaufs bzw. des Probenlaufes vergrößert dargestellt. Es kann eine Erhöhung des UV-Signals von etwa 0,012 AU auf 0,02 AU festgestellt werden. Die Differenz beträgt nur 0,008 AU. Eindeutiger ist die Veränderung des UV-Signals im Elutionsbereich bei Erhöhung der Ionenstärke auf 2 M. Aus den Abbildungen F-I und F-II kann eine Differenz von $0,17 - 0,04 = 0,13$ AU abgelesen werden. Es ist ein deutlicher Peak als Indiz für die Elution von Lactoferrin sichtbar.

Mit dem chaotropen Agens Guanidin-HCl konnte ebenfalls Protein eluiert werden. Nach etwa 18 Minuten Laufzeit ist im Vergleich zum Chromatographielauf ohne Lactoferrin nun ein neuer Peak auszumachen (siehe Abbildungen D-I und D-II). Dieser hat eine wesentlich höhere Dimension als der Peak mit Kaliumthiocyanat, die Differenz im UV-Signal beträgt etwa 0,91 AU.

Die Elutionspuffer E4 und E6, respektive 2 M Guanidin-HCl und 2 M Kaliumthiocyanat in Vorlagepuffer 1, wurden für die weiteren Untersuchungen als Elutionsmittel der Wahl eingesetzt.

Die Variation der pH-Werte durch die Verwendung von 20 mM Borsäure pH 9.0 und 20 mM Natriumhydrogencarbonat pH 10.0 brachte keine weiteren positiven Effekte. Sowohl

der Leerlauf als auch der Probenlauf zeigten mit 2 M Urea als elutionsbestimmende Substanz nahezu übereinstimmende Chromatogramme (siehe M-I, M-II und N-I, N-II).

4.2 Elution von Lactoferrin in Molke

Aufbereitete Molke wurde mit den aus den Vorversuchen ermittelten Elutionsmitteln untersucht.

Dem Chromatogramm O-II kann entnommen werden, dass das Einfügen einer Vorelution mit 2 M NaCl, sinnvoll war. Ebenfalls gebundene Proteine, die laut Ausschlussverfahren nicht Lactoferrin sein sollten (sonst wäre die Voruntersuchung mit E2 positiv gewesen), eluierten, zumindest teilweise, bei Erhöhung der Salzkonzentration. Von der Vorelution werden ebenfalls Fraktionen gesammelt und analytisch untersucht.

Es kann festgestellt werden, dass die Lactoferrinkonzentration in der aufbereiteten Molke so gering ist, dass das Protein sowohl mit Guanidin-HCl als auch mit Kaliumthiocyanat nicht als verändertes UV-Signal nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildungen O-II und Q-I). Diese Chromatogramme können dementsprechend als Leerläufe bezeichnet werden. Lactoferrin wurde deshalb extern mit einer Konzentration von 110 µg/mL zugesetzt. Daraufhin änderte sich dieses Bild.

Bei der Untersuchung von mit Lactoferrin versetzter Molke mit 2 M Guanidin-HCl (siehe Abbildungen P-I/II) konnte unerwarteter Weise keine Elution UV-spektrometrisch nachgewiesen werden. Der Elutionspeak blieb im Gegensatz zu den Voruntersuchen (Abbildungen D-I/II) aus. Diese Methode wurde zur Sicherheit ein weiteres Mal wiederholt. Es konnte jedoch erneut keine Elution festgestellt werden, der erste Lauf wurde bestätigt.

In den Abbildungen R-I und R-II sind die Ergebnisse der Untersuchung von mit Lactoferrin versetzter Molke mit 2 M Kaliumthiocyanat visualisiert. Es zeigt sich, dass bei der Probenaufgabe sehr viele Probenbestandteile nicht binden und mit der mobilen Phase durch die Säule transportiert werden. Die Vorelution mit 2 M NaCl entfernt weitere Proteine. Im Gegensatz zu Guanidin-HCl kann mit Kaliumthiocyanat Lactoferrin vom Säue-

lenmaterial eluiert werden. Bei der Aufarbeitung von 5 mL Molke teilt sich der Elutionspeak auf. Die verschiedenen Fraktionen der zwei Peaks werden jeweils gepoolt und anschließend weiterhin getrennt voneinander aufgearbeitet. Die Peakform der Elution im Lauf von 35 mL aufzureinigender Molke stimmt dahingegen mit den Voruntersuchungen überein. Die UV-Absorbanz steigt jedoch auf Grund der erhöhten applizierten Lactoferrinmenge noch höher auf 0,434 AU (Tag bei 138,1 mL).

4.3 Entsalzung

Im Anhang sind die Chromatogramme der Entsalzung von Proben aus dem Lauf Molke 2.2 zu finden. Bei diesem wurden 35 mL Molke, versetzt mit 110 µg/mL bovinem Lactoferrin, mit dem Elutionsmittel 2 M Kaliumthiocyanat in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 aufgereinigt. Aus den drei Bereichen Probenaufgabe, Vorelution mit 2 M NaCl und Elution mit Puffer E6 wurden gepoolte Fraktionen mit der SEC entsalzt und in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 umgepuffert. Es zeigt sich, dass eine verringerte Fließgeschwindigkeit und ein kleineres Probevolumen zu einer besseren Trennung des Proteinpeaks vom Salzpeak führen. Bereits nach 2 CV nach Injektion wurde Nulllinie wieder erreicht.

Die Proben wurden in 0,5 mL-Fraktionen gesammelt, um den Verdünnungseffekt beim Poolen des entsalzten Proteinpeaks klein zu halten.

4.4 Analytische Untersuchung mittels SDS-PAGE

Es wurden verschiedene Gele erstellt, die einerseits die Markerproteine, das Ausgangsmaterial Molke und aufgearbeitete Molke sowie die Fraktionen aus den affinitätschromatographischen Läufen und den entsalzten Fraktionen zeigen.

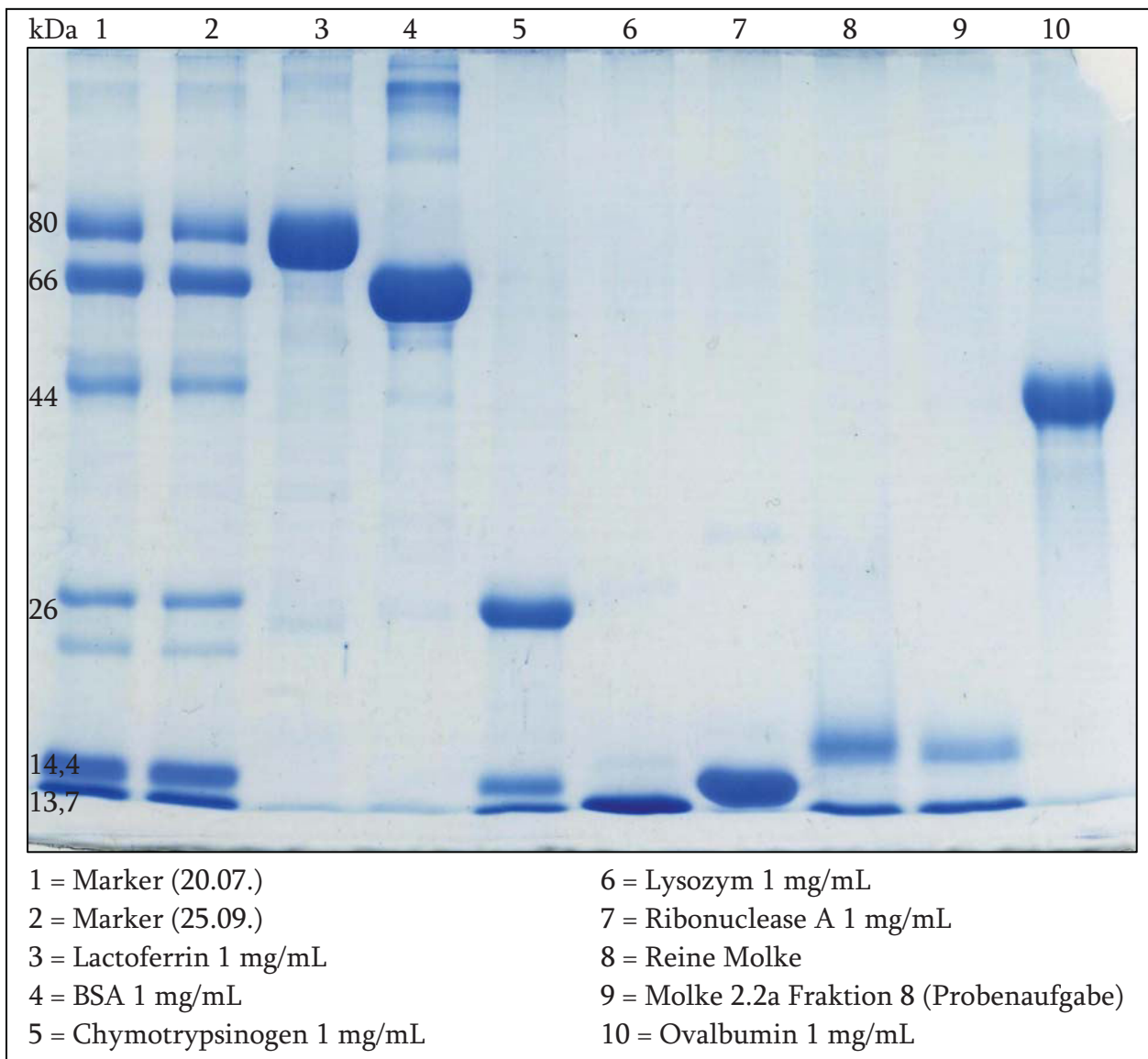


Abb. 4.1: Gel 1: Überprüfung der angesetzten Marker inklusive einzelnes Auftragen der Markerproteine, sowie Auftrennung des Ausgangsprobenmaterials Molke und einer einzelnen Fraktion aus der Probenaufgabe von Lauf Molke 2.2

Um sicher zu gehen, dass die angesetzten Marker eine gute Auftrennung zeigen, wurden sie in Gel 1 überprüft. Dementsprechend wurden auch die jeweiligen Markerproteine in einer Spur aufgetragen.

In Spur 8 ist Reine Molke aufgetrennt worden. Es ist deutlich erkennbar, dass kaum Proteine enthalten sind. Die prominenten Banden liegen im Bereich zwischen 13 und 26 kDa. Dies deckt sich mit den Molekulargewichten der Hauptbestandteile von Molke: β -Lactoglobulin mit 18,4 kDa und α -Lactalbumin mit 14,178 kDa. Hier nicht zu erkennen ist BSA mit 66 kDa.

β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin haben nicht an den Liganden der Affinitätschromatographischen Säule HiTrap Blue HP, Cibracon Blue F3-GA, gebunden. Sie wurden mit der Fraktion 8 bei der Applikation der Probe eluiert.

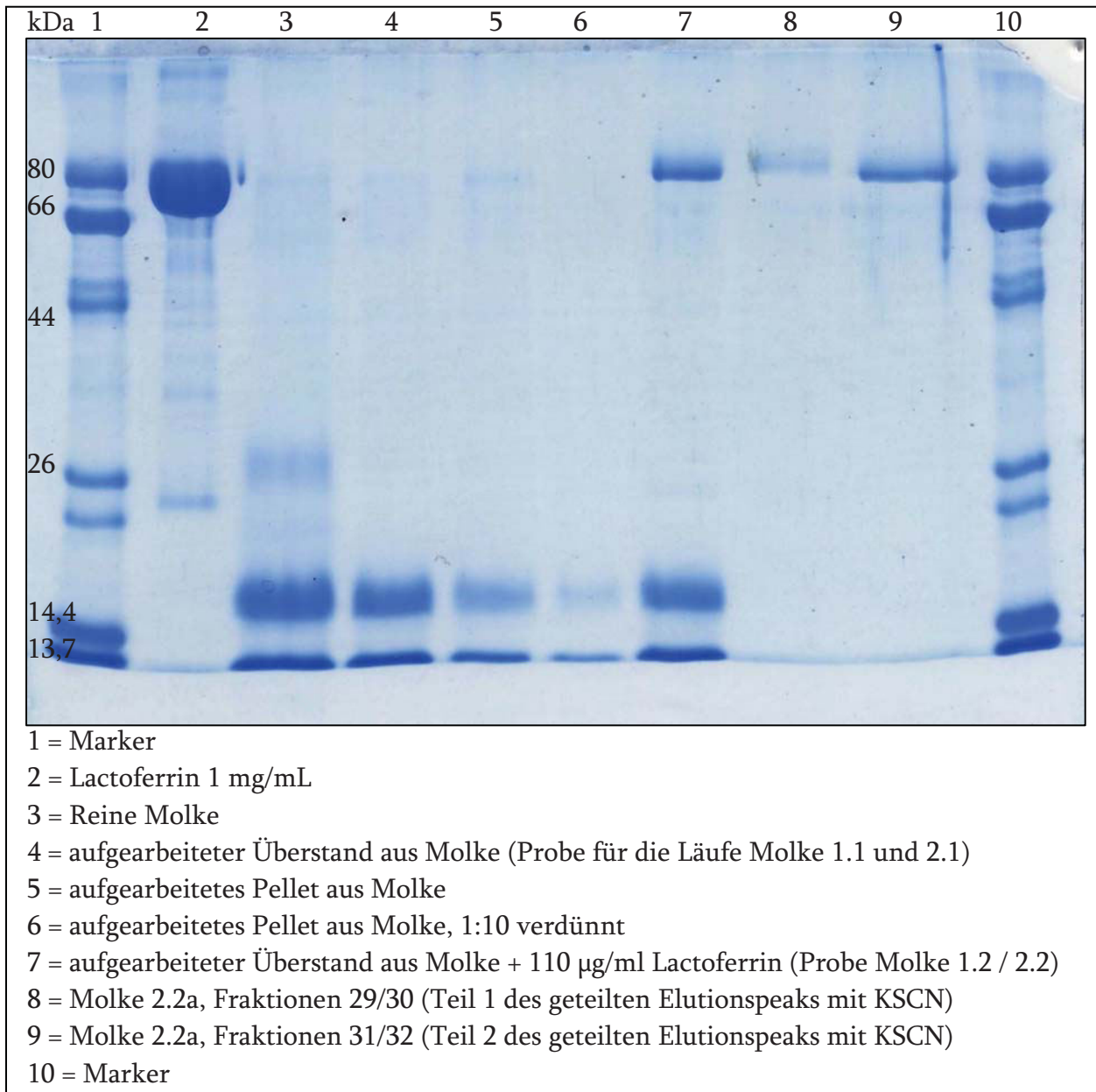


Abb. 4.2: Gel 2: Untersuchung von einzelnen Aufarbeitungsschritten von Molke; Ursprungsprodukt (Reine Molke), Produkte der Thermocalzischen Präzipitation (Überstand, Pellet), Probenmaterial für die Affinitätschromatographische Aufreinigung (Molke + Lf), eluierte Fraktionen mit 2 M Kaliumthiocyanat

Bei der Probenaufbereitung für die SDS-PAGE von einzelnen Molkeproben aus unterschiedlichen Phasen der Aufreinigung sind einige Anmerkungen zu machen:

Es konnte ein Farbumschlag von blau zu hellgrün in der Probe „Reine Molke“ beobachtet werden, der durch den niedrigen pH-Wert von Reiner Molke und einer Veränderung des Bromphenolblaus im Probenpuffer zu erklären ist.

Das Pellet, welches nach der thermischen Behandlung mit Calciumchlorid ausfiel, hatte eine gelartige Konsistenz, die sich auch nicht durch die Zugabe von SDS oder 2-Mercaptoethanol veränderte. Es ist davon auszugehen, dass es sich um Aggregate von restlichen Fettbestandteilen in der Molke handelt. Das Pellet an sich konnte nicht auf das Gel aufgeladen werden, auch wenn dieses mit physiologischer Kochsalzlösung 1:10 verdünnt wurde. Stattdessen wurden 15 μL des entstehenden Überstandes bei der Probenvorbereitung auf das Gel aufgetragen. Dieser enthielt ebenso wie der klare Molkeüberstand nach der Präzipitation die Molkenproteine β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin.

Diesem aufgereinigten Molkeüberstand wurde extern 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lactoferrin zugefügt, was in Spur 7 deutlich zu erkennen ist. Auch stimmt das Verhältnis der Bande von 1 mg/mL bovinem Lactoferrin in Spur 2 zu dieser neu auftretenden Bande in Spur 7.

In Abbildung 4.2 sind ebenso Fraktionen der Elution mit 2 M Kaliumthiocyanat (KSCN) des Probelaufes Molke 2.2a, bei dem 5 mL der Probe (in Spur 7) auf die Affinitätssäule aufgetragen wurden (Abbildung R-I), dargestellt. Der im Linearen Gradienten auftretende Peak als Indiz für die Desorption von Lactoferrin spaltete sich auf. In der SDS-PAGE können die beiden Peakbereiche analysiert werden. Es ist jeweils reines Lactoferrin eluiert worden, allerdings in unterschiedlich hohen Konzentration, was den Peakflächen entspricht. Bei der Probenvorbereitung erschienen die Proben etwas viskoser und milchig blau, was auf den hohen Salzgehalt in den Proben zurückzuführen sein dürfte.

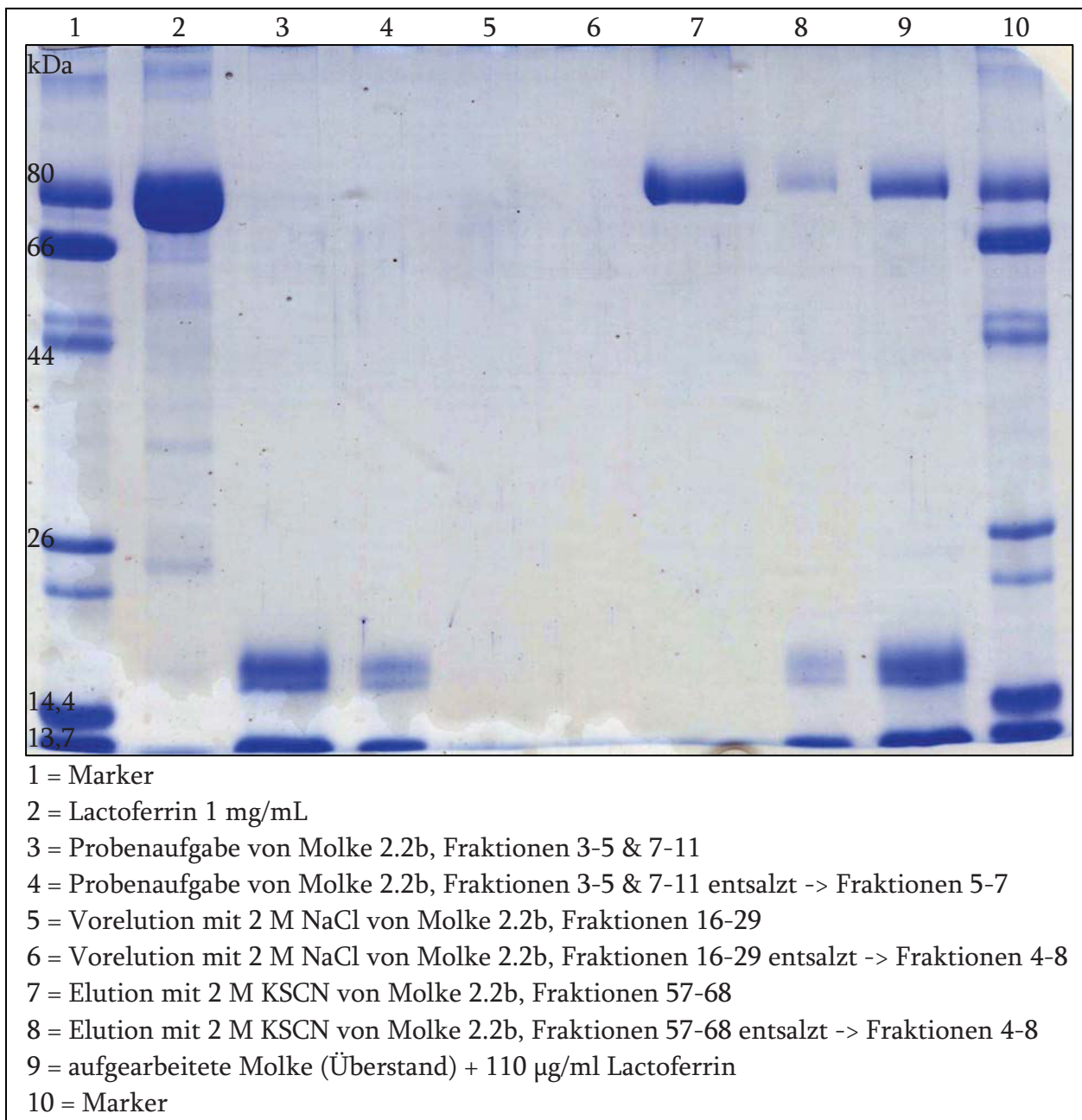


Abb. 4.3: Gel 3: Untersuchung von Fraktionen des Probelaufes Molke 2.2b, bei dem 35 mL mit Lactoferrin versetzte Molke aufgereinigt wurden; es sind jeweils die beim Affinitätschromatographischen Verlauf direkt genommenen Proben neben den entsalzten Fraktionen bei der Probenapplikation, der Vorelution mit 2 M NaCl und der Elution mit 2 M Kaliumthiocyanat aufgetragen

In Analogie zu den Elutionsproben des Gels 2 ist die Probe in Spur 7 der Abbildung 4.3 bei der Probenvorbereitung etwas heller. Da das entsalzte Pendant in Spur 8 keine Aufhellung aufwies, kann mit Sicherheit von Effekten durch die hohe vorhandene Konzentration an Kaliumthiocyanat ausgegangen werden.

Im Tris/HCl-Gel 3 sind wiederholt Proben zum Zeitpunkt der Probenaufgabe aufgetragen worden. Die Banden in Spur 4 erscheinen im Vergleich zur Spur 3 lediglich etwas heller, was auf Verdünnungseffekte bei der Entsalzung der Probe zurückzuführen ist. Es sind wiederum β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin zu identifizieren, die nicht an den Triazin-Farbstoff gebunden haben.

In den Spuren 5 und 6 sind keine Proteinbanden zu finden. Schon im UV-Spektrum in dem Zeitintervall der Vorelution mit 2 M NaCl ist kein starker Anstieg zu notieren, siehe Abbildung R-II im Anhang. Dies könnte am abgeänderten Profil liegen. Ein linearer Gradient ist hier dem Stufengradient vorzuziehen.

Besonders stark tritt die einzelne Lactoferrin-Bande in Spur 7 auf. Es handelt sich um die nicht entsalzte Probe, die in bis zu 2 M Kaliumthiocyanat vorliegt. Sie entspricht einem hohen UV-Signal, das durch die Injektion von 3,5 mg Lactoferrin in diesem Probelauf hervorgerufen worden ist. Durch die Entsalzung scheint sehr viel Protein verloren worden zu sein.

Schließlich ist in Spur 9 die zu Laufbeginn vorliegende Probe aufgetragen worden, d.h. die Addition der Banden vorangegangener Spuren müsste den Banden dieser Spur entsprechen.

Den Gelen ist zu entnehmen, dass Lactoferrin als reine Bande mit der Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte. Die Molkenproteine β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin wurden vor der Elution ausgewaschen. Lediglich das Salz des Elutionsmittels muss noch entfernt werden, was durch die Größenausschlusschromatographie erreicht werden kann.

4.5 Vergleich und Bewertung der Ergebnisse

Aus der Vielzahl an untersuchten potentiellen Elutionsmitteln für die Desorption von bovinem Lactoferrin von Cibacon Blue F3-GA haben sich nach den Vorversuchen 2 M Guanidin-HCl und 2 M Kaliumthiocyanat in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 als wirksam erwiesen. Sie zeigten beim Vergleich der Chromatogramme des Leerlaufes und des Probenlaufes

fes einen signifikanten Unterschied im UV-Signal beim Linearen Gradienten mit dem Elutionsmittel.

Es ist bekannt, dass diese chaotropen Agenzien strukturelle Veränderung von Proteinen hervorrufen können. Insbesondere bei hohen Ionenkonzentrationen besteht jedoch die Gefahr der Denaturierung, welche mit einem Verlust der biologischen Aktivität einhergeht.

Bei der Aufreinigung von Sauermolke, der Lactoferrin zugesetzt wurde, hat sich das Kaliumthiocyanat durchgesetzt. Es konnte das Glykoprotein auch aus größeren Probevolumina vom Triazinfarbstoff lösen. Bei der Untersuchung dieser eluierten Fraktionen konnte eine hohe Reinheit mit der SDS-PAGE festgestellt werden. Andere in Molke enthaltene Proteine wie β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin binden nicht an den affinitätschromatographischen Träger und werden bei der Probenaufgabe ausgewaschen bzw. können durch eine sogenannte Vorelution mit 2 M NaCl als linearer Gradienten abgetrennt werden.

Bei der Probenaufbereitung von Molke erwies sich die thermische Präzipitation mit Calcium als erfolgreich. Ein großer Teil von Fetten aggregierte.

Bei der Verwendung von Kaliumthiocyanat ist jedoch darauf zu achten, dass es beim Ansäuern sehr giftige Gase bildet und schädlich für Wasserorganismen ist, wodurch eine sachgerechte Entsorgung bedacht werden muss.

5. Literatur

- Abe H., H. Saito, H. Miyakawa, Y. Tamura, S. Shimamura, E. Nagao, M. Tomita** (1991): Heat stability of bovine lactoferrin at acidic pH, *Journal of Dairy Sciences* 74: 65-71
- Almécija M.C., R. Ibáñez, A. Guadix, E.M. Guadix** (2006): Influence of pH in the recovery of lactoferrin from whey with ceramic membranes, *Desalination* 200(1-3): 475-476
- Alwan-al-Mashikhi S., S. Nakai** (1987): Isolation of bovine immunoglobulines and lactoferrin from whey proteins by gel filtration techniques, *Journal of Dairy Sciences* 70: 2486-2492
- Appelmelk B.J., Y.Q. An, M. Geerts, B.G. Thijs, H.A. de Boer, D.M. MacLaren, J. de Graaff, J.H. Nuijens** (1997): Lactoferrin is a lipid A-binding protein, *Infection and Immunity* 62 (6): 2628-2632
- Bezwoda W.R., N. Mansoor** (1986): Isolation and characterization of lactoferrin separated from human whey by adsorption chromatography using Cibracon Blue F3G-A linked affinity adsorbent, *Clinica Chimica Acta* 157: 89-94
- Brisson G., M. Britten, Y. Pouliot** (2007): Heat-induced aggregation of bovine lactoferrin at neutral pH: Effect of iron saturation, *International Dairy Journal* 17(6): 617-624
- Calvo A., F. Batistaviera** (1994): Isolation of lactoferrin by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), *Biochemical Education* 22(1): 50-52
- Chen L., C.Guo, Y. Guan, H. Liu** (2007): Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation, *Separation and Purification Technology* 56: 168-174
- Cheng J.B., J.Q. Wang, D.P. Bu, G.L. Liu, C.G. Zhang, H.Y. Wei, L.Y. Zhou, J.Z. Wang** (2008): Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk, *Journal of Dairy Sciences* 91(3): 970-976
- GE Healthcare** (10/2006): HiTrap Blue HP, Data File
- GE Healthcare** (01/2007): Handbook Gel Filtration, Principles and Methods
- GE Healthcare** (02/2007): Handbook Protein Purification
- GE Healthcare** (03/2007): HiTrap Desalting columns, Instructions
- GE Healthcare** (10/2007): Handbook Affinity Chromatography, Principles and Methods
- GE Healthcare** (02/2009): Affinity chromatography columns and media, Selection Guide

- González-Chávez S.A., S. Arévalo-Gallegos, Q. Rascón-Cruz** (2009): Lactoferrin: structure, function and applications, *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 301.e1-301.e8
- Grasselli M., O. Cascone** (1996): Separation of lactoferrin from bovine whey by dye affinity chromatography, *Netherlands Milk & Dairy Journal* 50(4): 551-561
- Houen G., E.V. Högdall, V. Barkholt, L. Nørskov** (1996): Lactoferrin: similarity to diamine oxidase and purification by amionhexyl affinity chromatography, *European Journal of Biochemistry* 241: 303-308
- Hurley W.L., R.C.J. Grieve, C.E. Magura, H.M. Hegarty, S.Zou** (1993): Electrophoretic Comparisons of Lactoferrin from Bovine Mammary Secretions, Milk Neutrophils, and Human Milk, *Journal of Dairy Sciences* 76: 377-387
- Lottspeich F., J. Engels** (Hrsg.) (2006): *Bioanalytik*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Ounis W.B., S. Gauthier, S.L. Turgeon, S. Roufik, Y. Pouliot** (2008): Separation of minor protein components from whey protein isolates by heparin affinity chromatography, *International Dairy Journal* 18: 1043-1050
- Plate K., S. Beutel, H. Buchholz, W. Demmer, S. Fischer-Frühholz, O. Reif, R. Ulber, T. Scheper** (2006): Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion fo bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography, *Journal of Chromatography A* 1117: 81-86
- Rombaut R., K. Dewettinck** (2007): Thermocalcic aggregation of milk fat globule membrane fragments from acid buttermilk cheese whey, *Journal of Dairy Sciences* 90: 2665-2674
- Shimazaki K., N. Nishio** (1991): Interacting properties of bovine lactoferrin with immobilized Cibracon Blue F3GA in column chromatography, *Journal of Dairy Sciences* 74(2): 404-408
- Steijns J.M., A.C. van Hooijdonk** (2000): Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin, *British Journal of Nutrition* 84(1): 11-17

- Tomita M., H. Wakabayashi, K. Yamauchi, S. Teraguchi, H. Hayasawa** (2002): Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications, *Biochemistry and Cell Biology* 80: 109-112
- Wakabayashi H., K. Yamauchi, M. Takase** (2006): Lactoferrin research, technology and applications, *International Dairy Journal* 16(11): 1241-1251
- Wolman F.J., D.G. Maglio, E.E. Smolko, M. Grasselli, O. Cascone** (2007): Lactoferrin purification from bovine whey and colostrum by affinity membrane chromatography, *Journal of Membrane Science* 288 (1-2): 132-138
- Wu M., Xu Y.** (2009): Isolation and purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion exchange chromatography, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14: 155-160
- Yoshida S.** (1989): Preparation of lactoferrin by hydrophobic interaction chromatography from milk acid whey, *Journal of Dairy Sciences* 72: 1146-1450
- Yoshida S., Ye-Xiuyun** (1991): Isolation of lactoperoxidase and lactoferrins from bovine milk acid whey by carboxymethyl cation exchange chromatography, *Journal of Dairy Sciences* 74: 1439-1444
- Yoshida S., Z. Wei, Y. Shinmura, N. Fukunaga** (2000): Separation of Lactoferrin-a and -b from bovine colostrum, *Journal of Dairy Sciences* 83: 2211-2215

6. Anhang

6.1 Affinitätschromatographische Chromatogramme

Übersichtstabelle 1:

Leerlauf: statt Probe wird Vorlagepuffer injiziert

Probenlauf: Injektion von 5 mL Vorlagepuffer, 100 µg/mL Lactoferrin

Elutionsmittel	Abbildungsnummer	
	Leerlauf	Probenlauf
E1: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 M KCl	A-I	A-II
E2: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl	B-I	B-II
E3: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Urea	C-I	C-II
E4: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-HCl	D-I	D-II
E5: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M Kaliumthiocyanat	E-I	E-II
E6: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Kaliumthiocyanat	F-I	F-II
E7: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Triton X-100	G-I	G-II
E8: 60% Ethanol	H-I	H-II
E9: 75% Ethylenglykol	I-I	-
E10: 25% Ethylenglykol	J-I	J-II
E11: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25% Ethylenglykol, 3 M KCl	K-I	K-II
E12: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25% Ethylenglykol, 2 M NaCl	L-I	L-II
EV2: 20 mM Borsäure pH 9.0, 2 M Urea	M-I	M-II
EV3: 20 mM Natriumhydrogencarbonat pH 10.0, 2 M Urea	N-I	N-II

Übersichtstabelle 2:

Arbeitstitel	Probe	Elutionsmittel	Abb.-Nr.	Inhalt
Molke 1.1	Molke	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-HCl	O-I O-II	Methodenreport Chromatogramm
Molke 1.2	Molke + Lf	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-HCl	P-I P-II	Chromatogramm Chromatogramm, Run 2
Molke 2.1	Molke	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Kaliumthiocyanat	Q-I	Chromatogramm
Molke 2.2a Molke 2.2b	Molke + Lf	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Kaliumthiocyanat	R-I R-II	Chromatogramm, 5 mL Chromatogramm, 35 mL

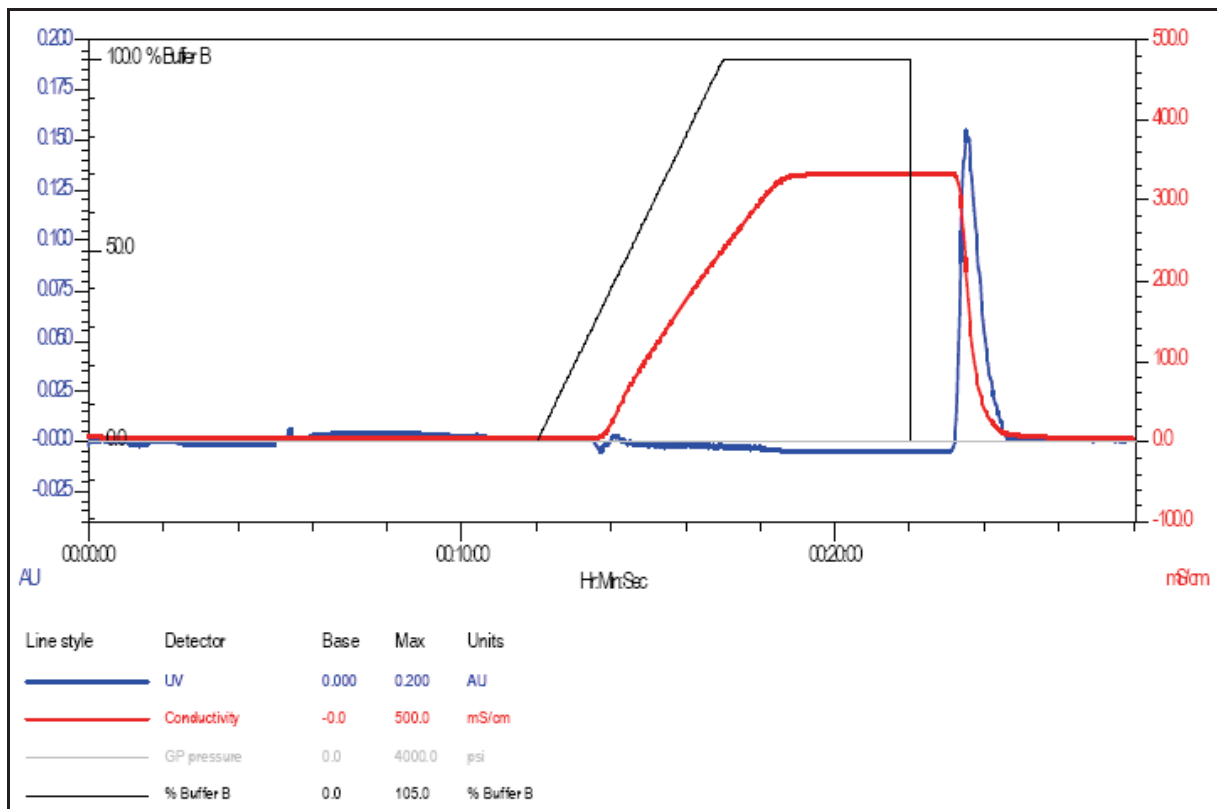


Abb. A-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E1 – 3 M KCl

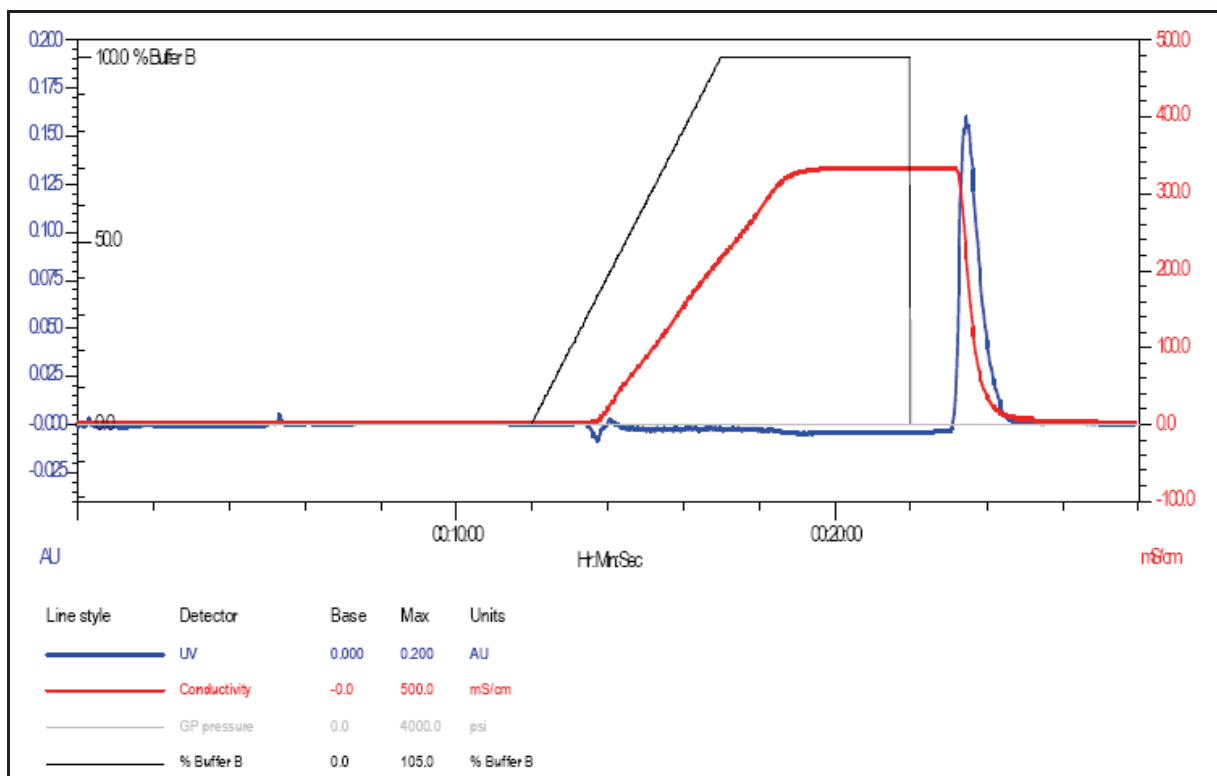


Abb. A-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E1 – 3 M KCl

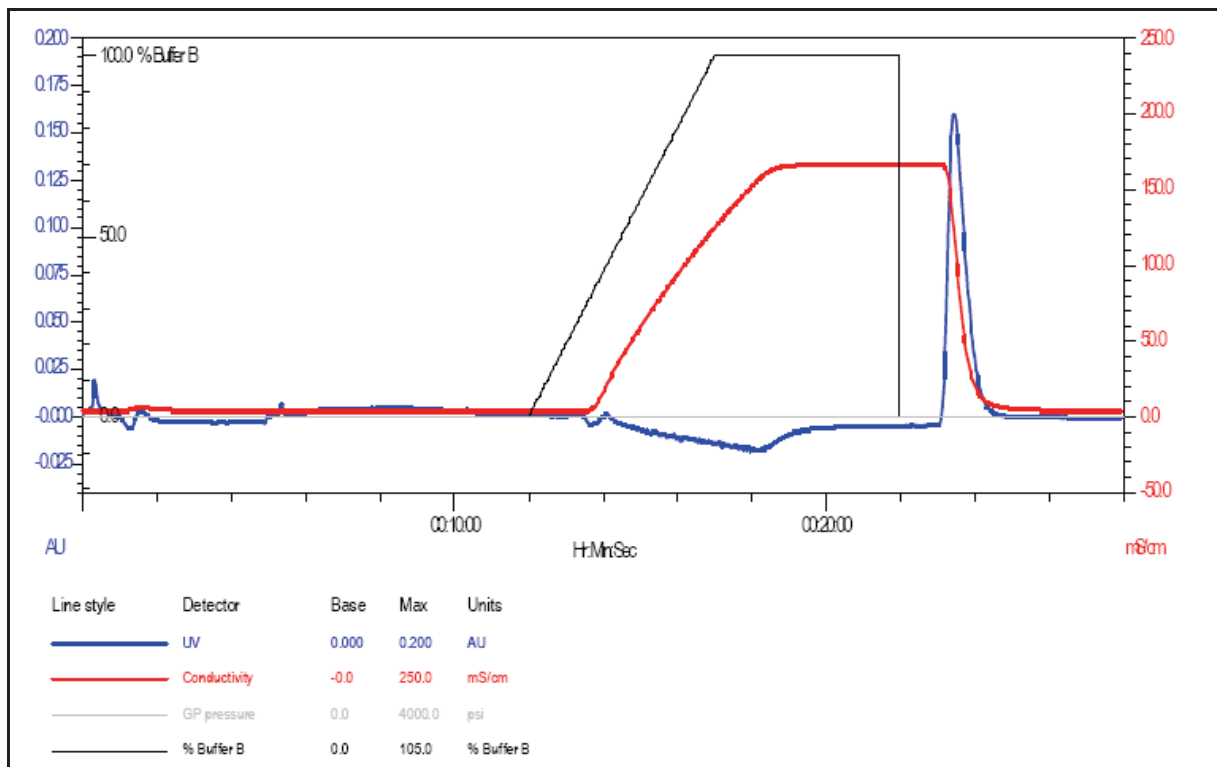


Abb. B-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E2 – 2 M NaCl

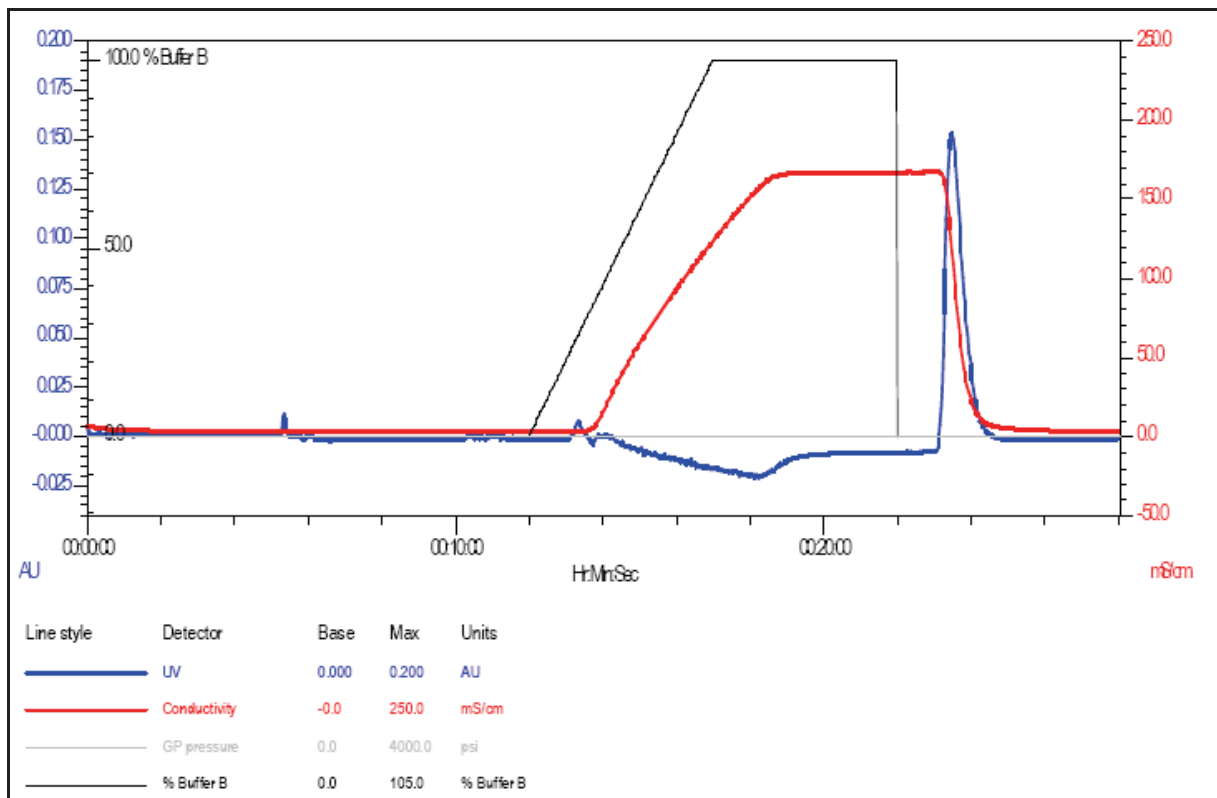


Abb. B-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E2 – 2 M NaCl

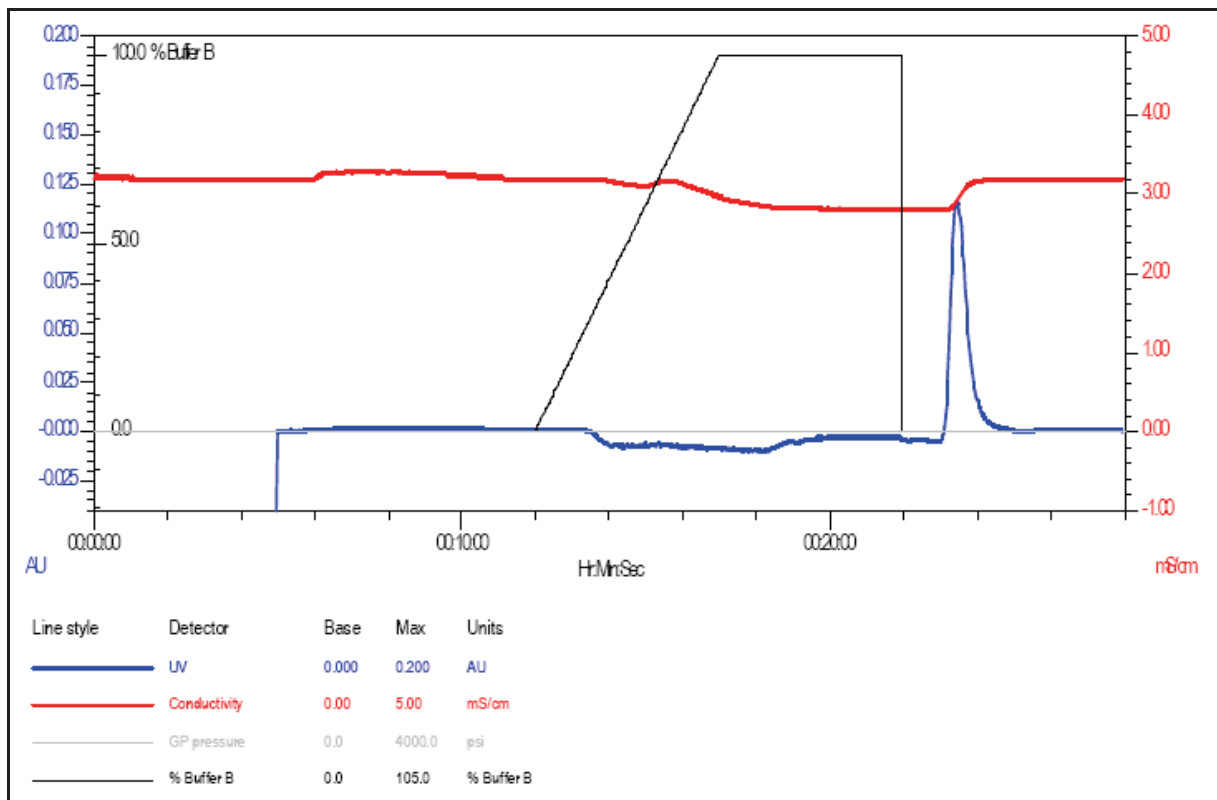


Abb. C-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E3 – 2 M Urea

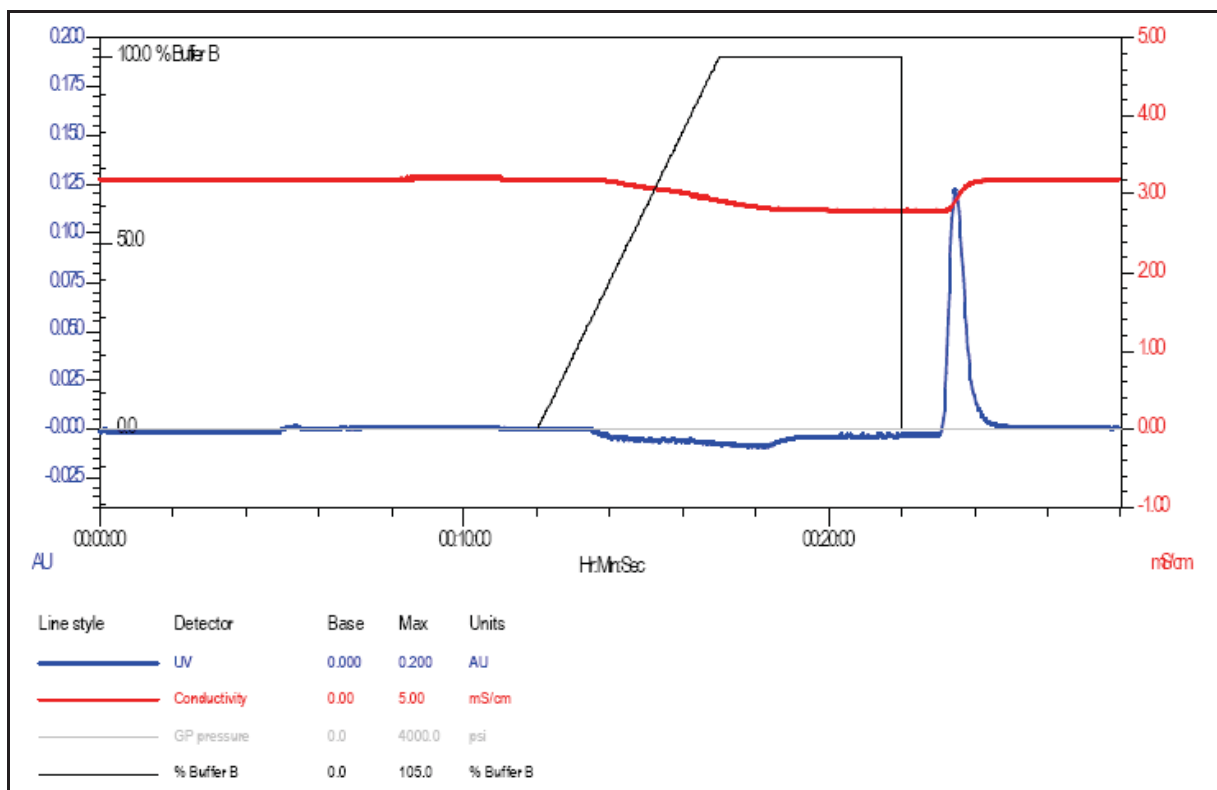


Abb. C-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E3 – 2 M Urea

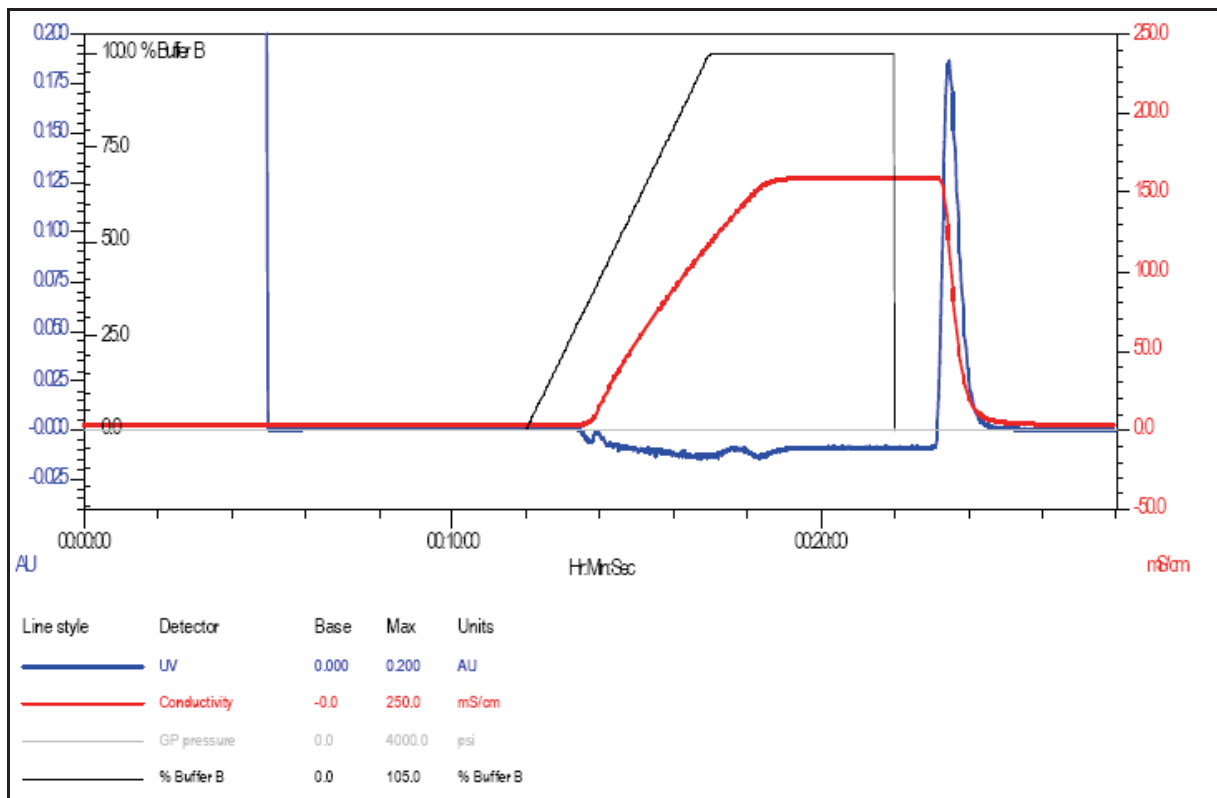


Abb. D-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E4 – 2 M Guanidin-HCl

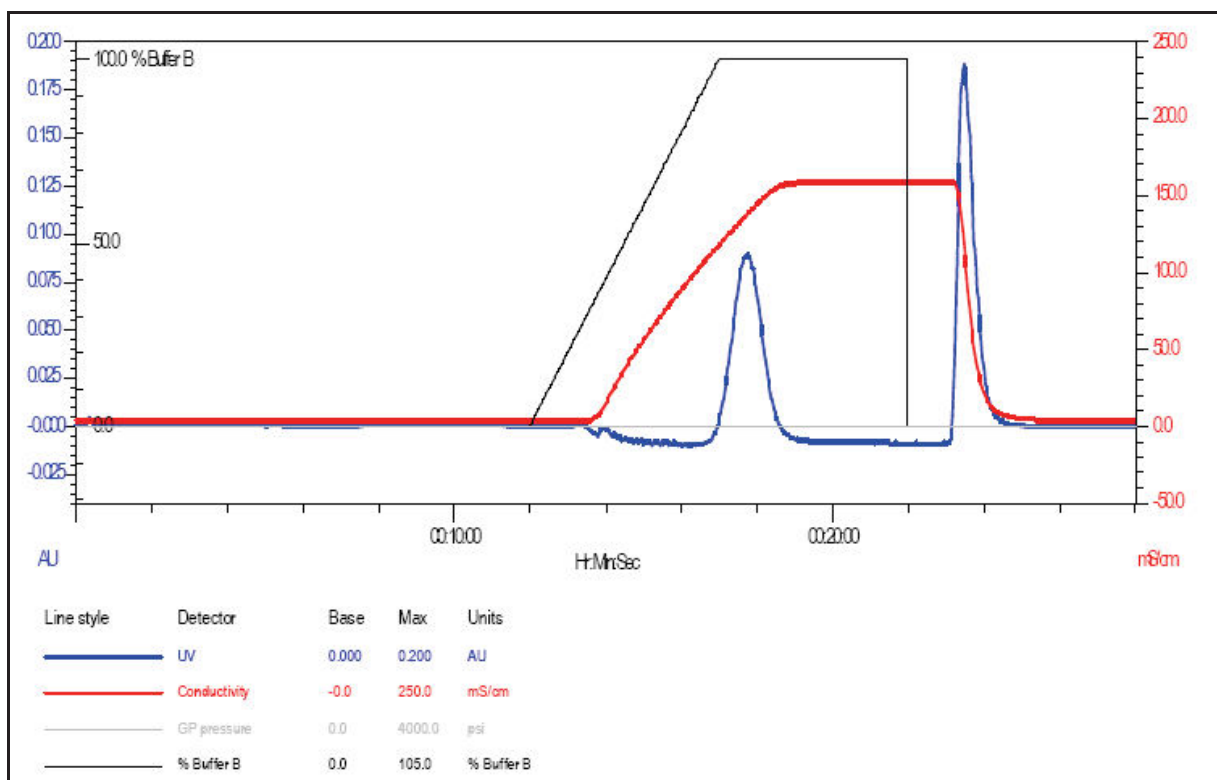


Abb. D-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E4 – 2 M Guanidin-HCl

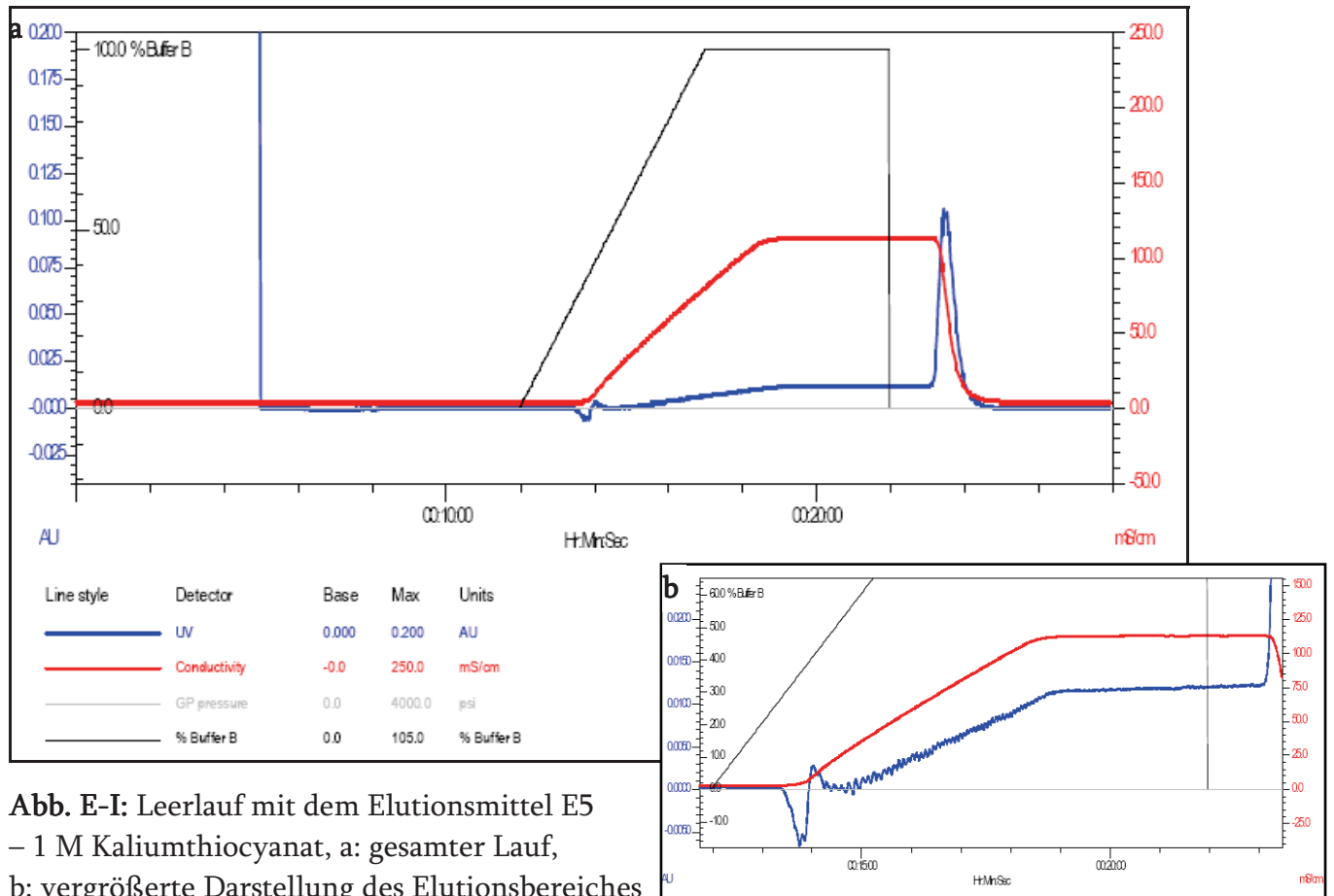


Abb. E-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E5 – 1 M Kaliumthiocyanat, a: gesamter Lauf, b: vergrößerte Darstellung des Elutionsbereiches

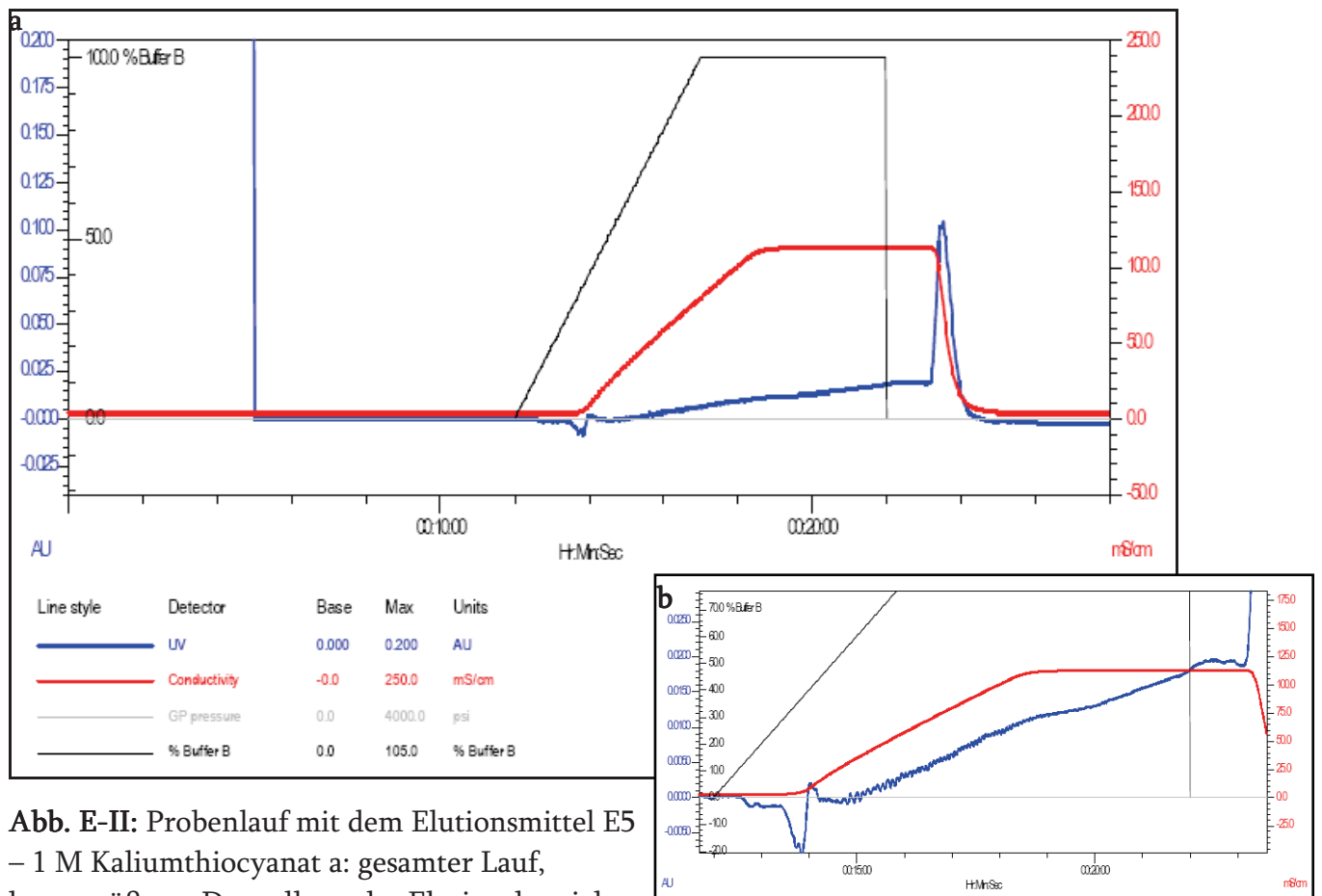


Abb. E-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E5 – 1 M Kaliumthiocyanat a: gesamter Lauf, b: vergrößerte Darstellung des Elutionsbereiches

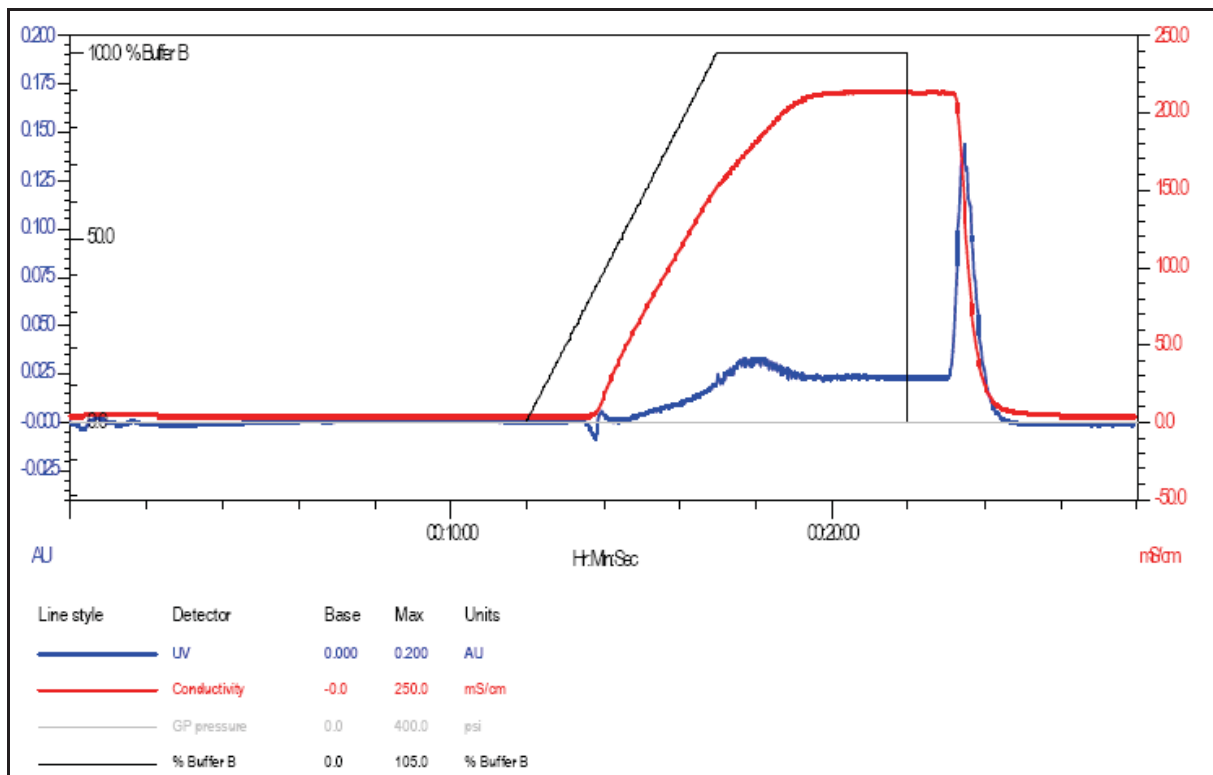


Abb. F-I: Leelauf mit dem Elutionsmittel E6 – 2 M Kaliumthiocyanat

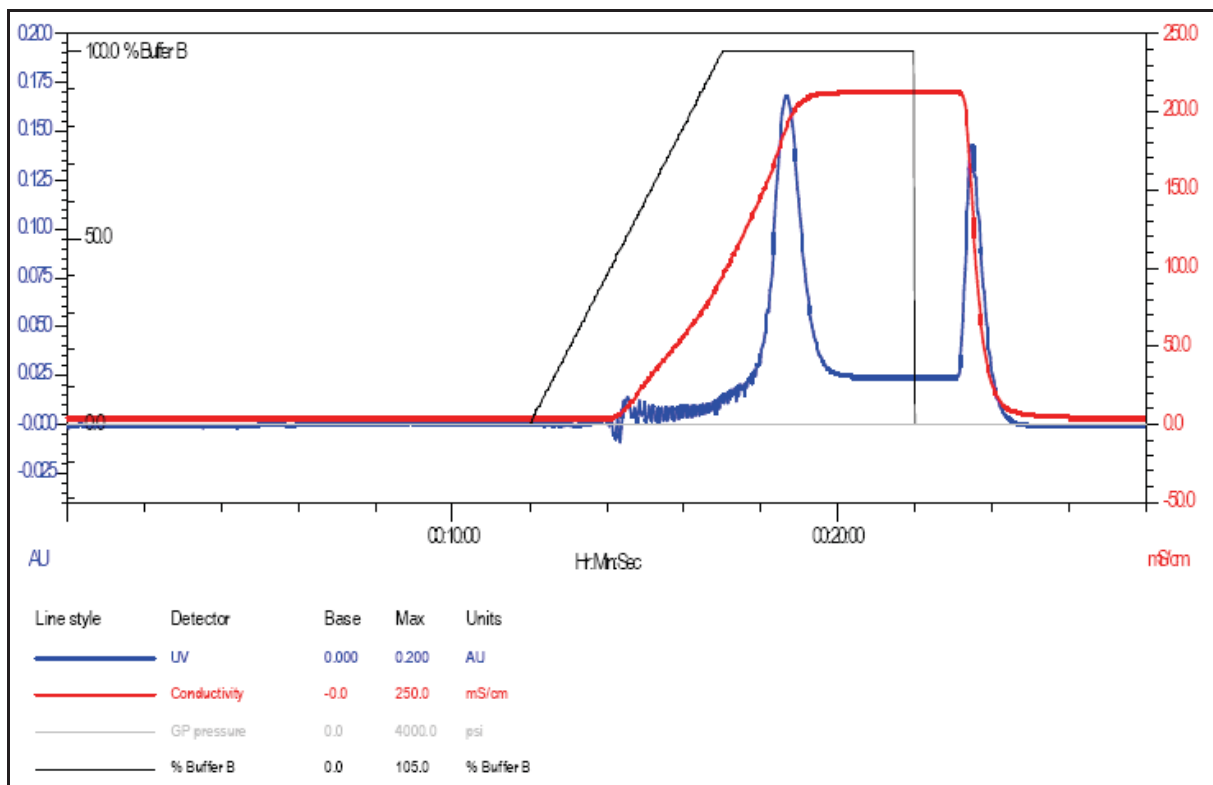


Abb. F-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E6 – 2 M Kaliumthiocyanat

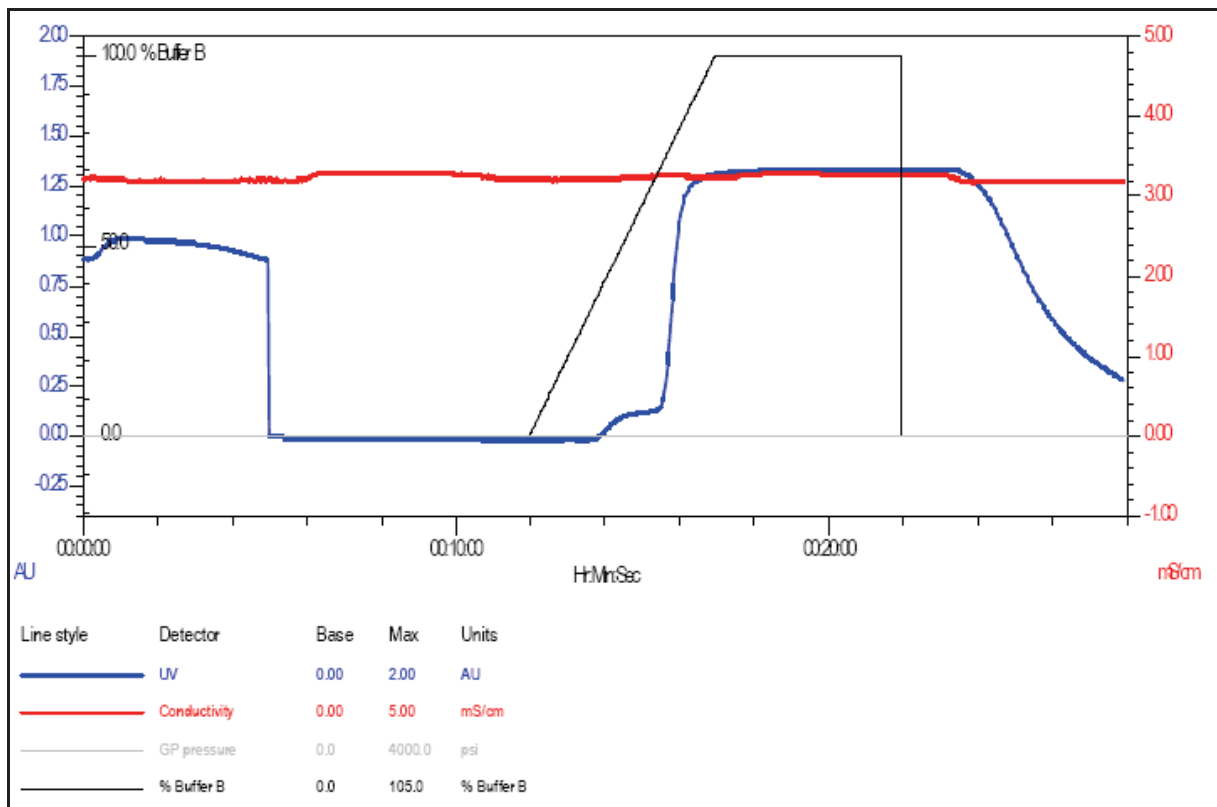


Abb. G-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E7 – 1% Triton X-100

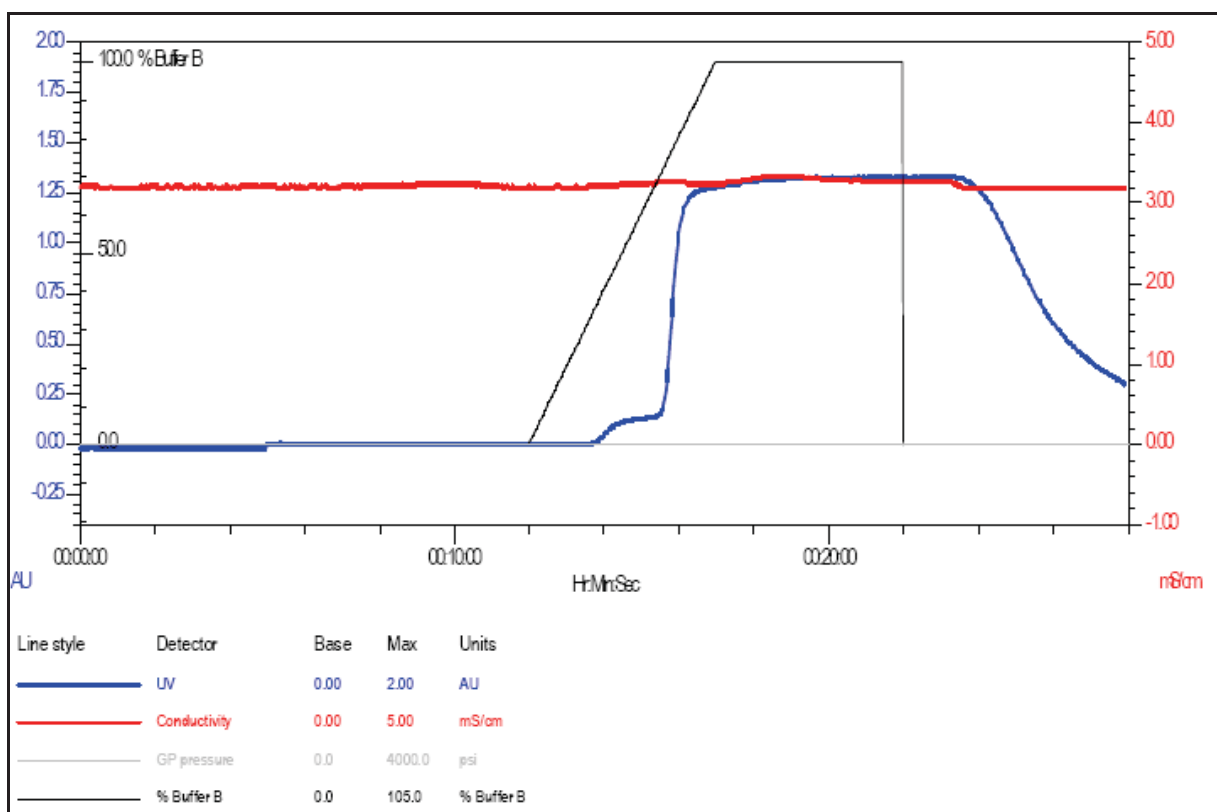


Abb. G-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E7 – 1% Triton X-100

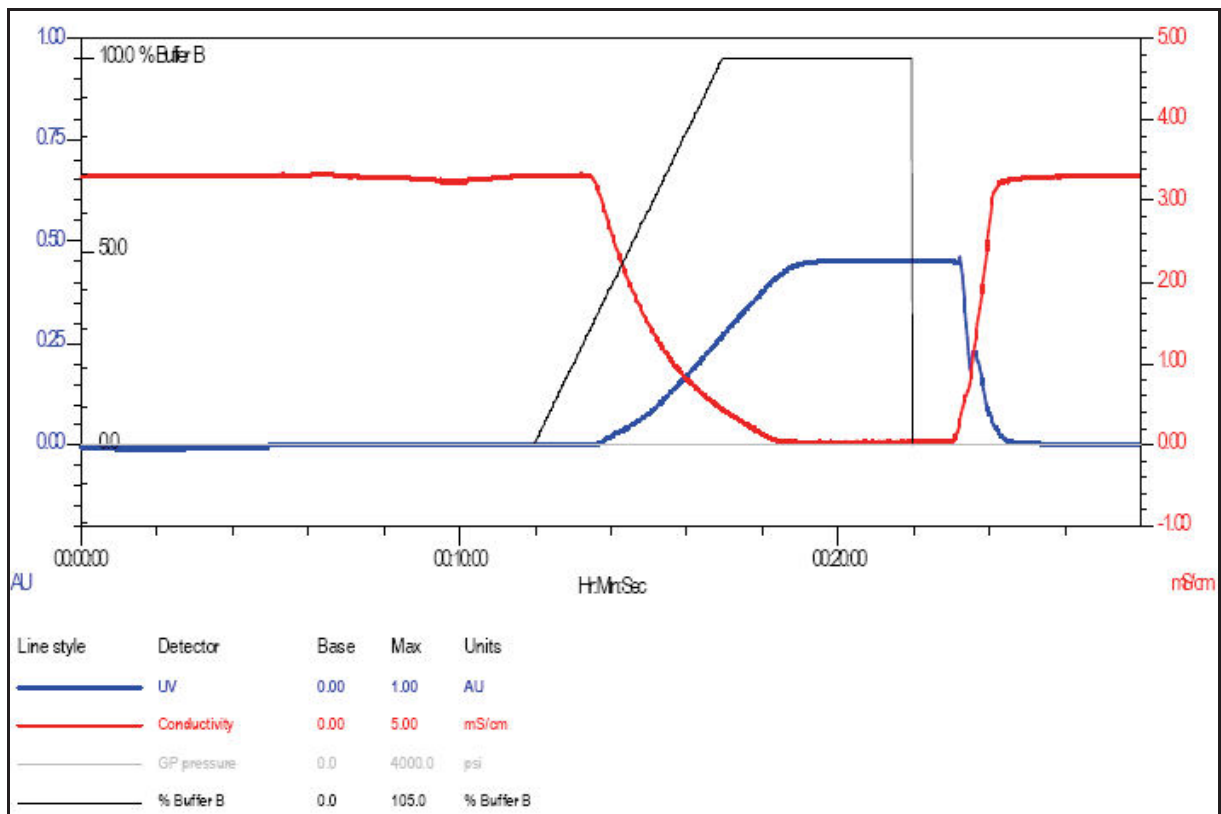


Abb. H-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E8 – 60% Ethanol

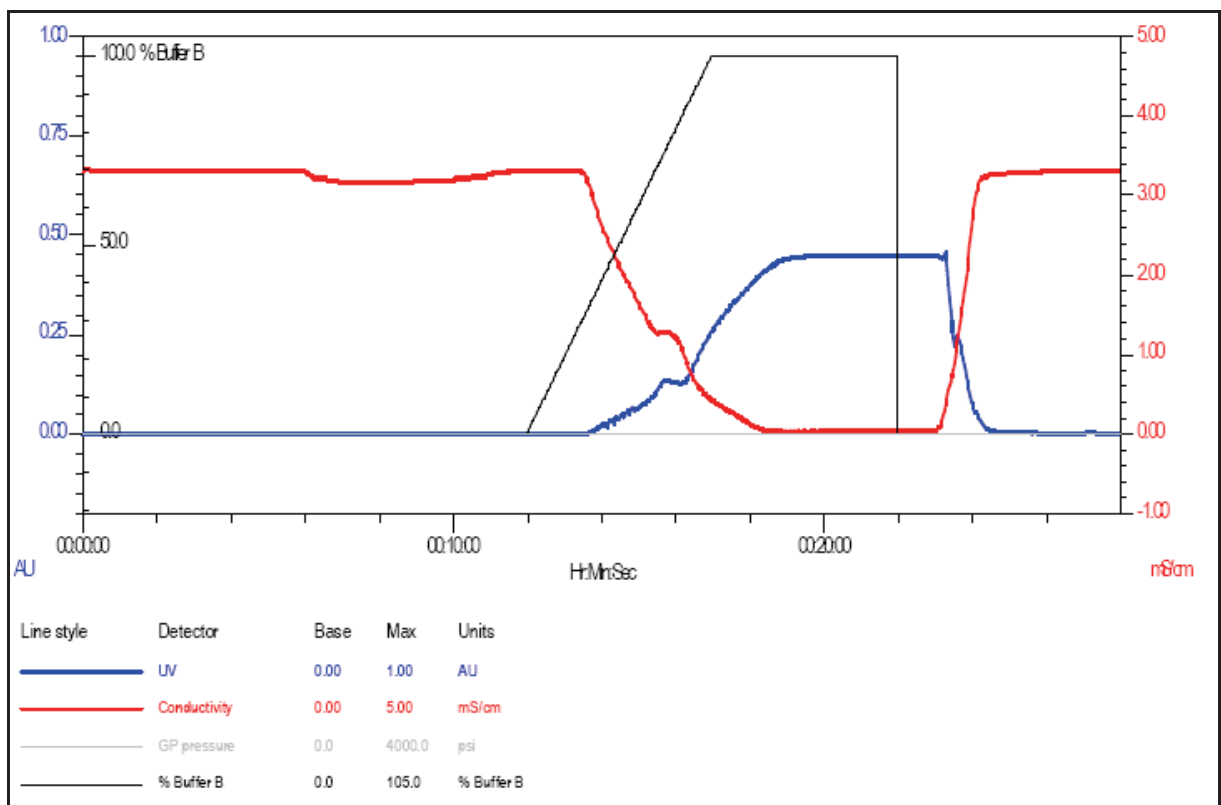


Abb. H-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E8 – 60% Ethanol

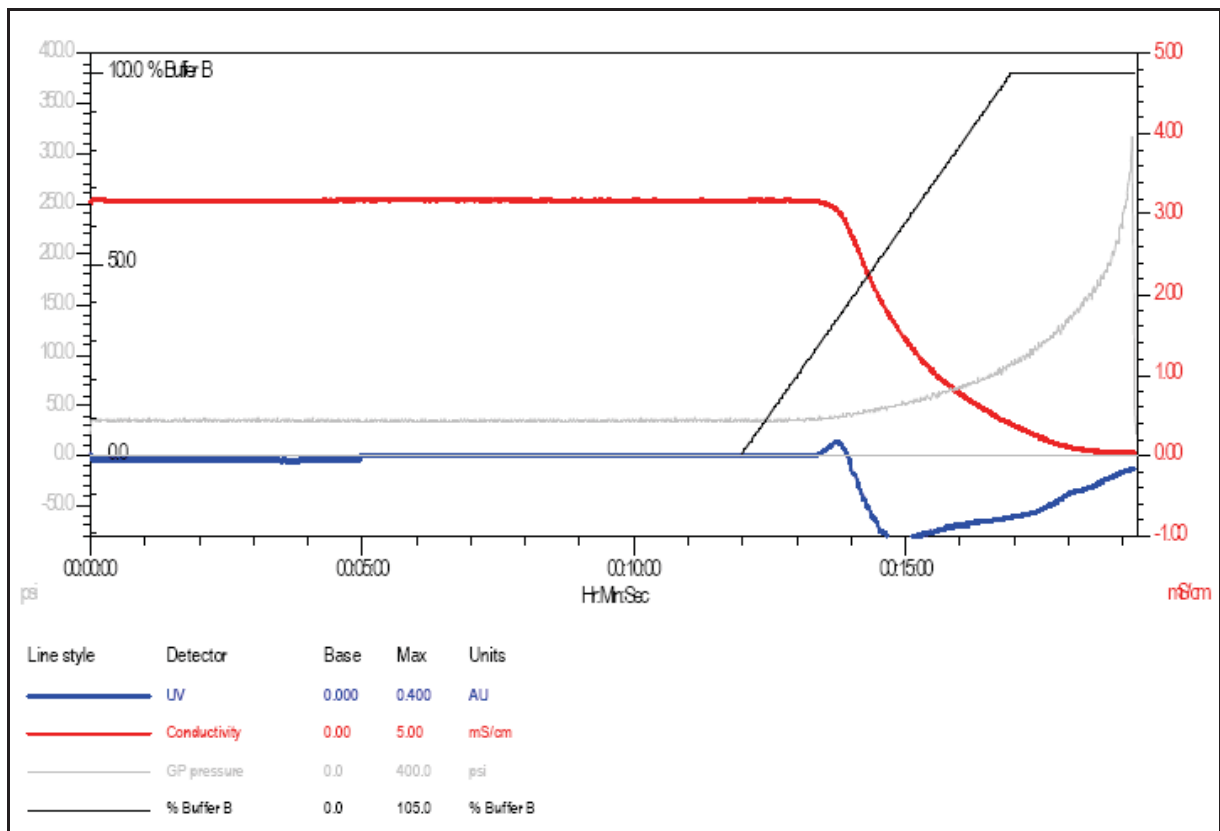


Abb. I-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E9 – 75% Ethylenglykol, aufgrund der erhöhten Viskosität von 75% Ethylenglykol Druckanstieg beim Aufbau des linearen Gradienten zu hoch, automatische Pumpenabstellung, Abbruch dieses Versuchs

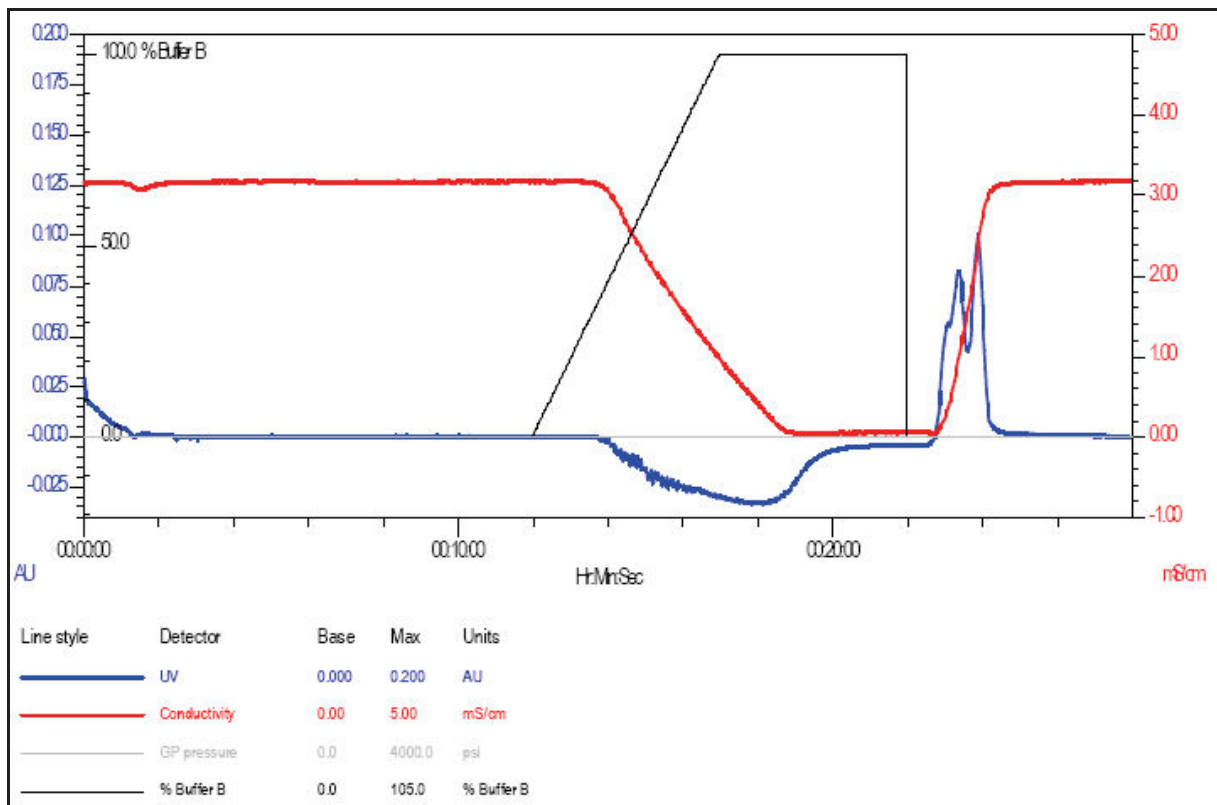


Abb. J-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E10 – 25% Ethylenglykol

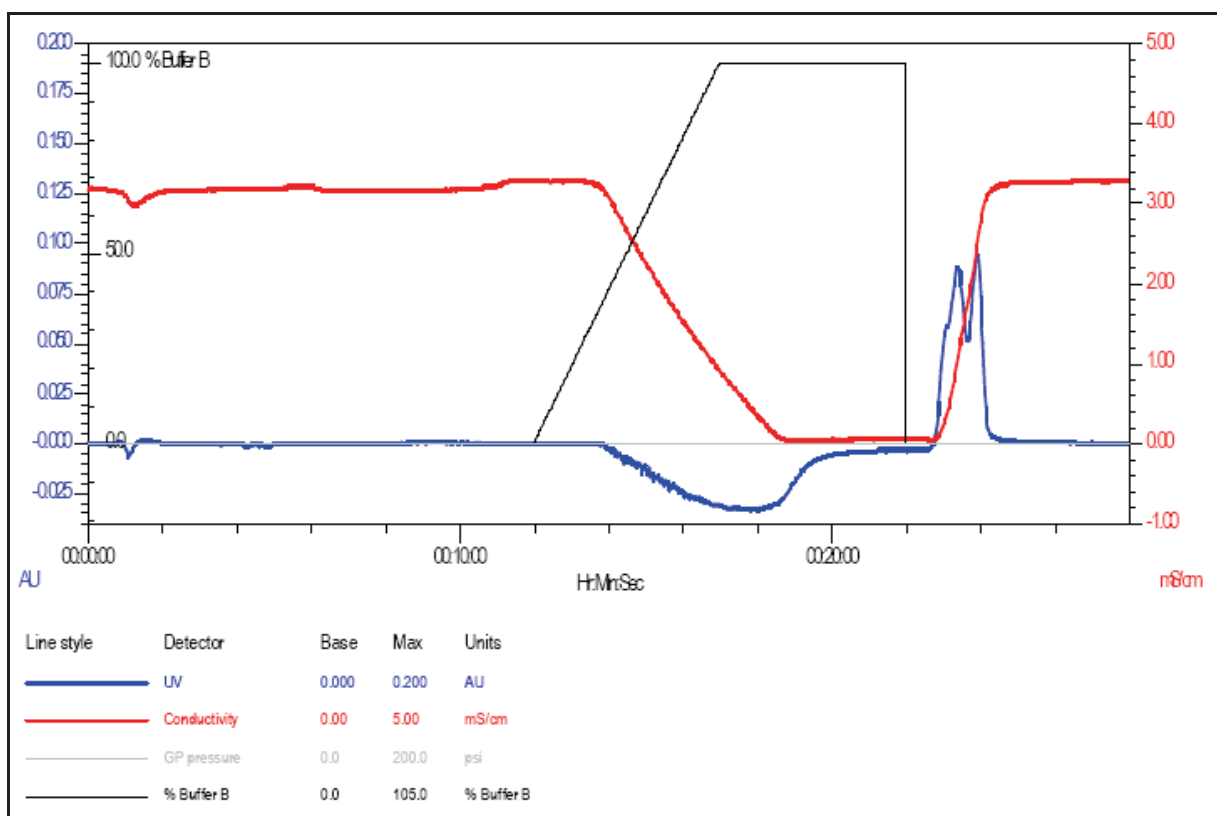


Abb. J-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E10 – 25% Ethylenglykol

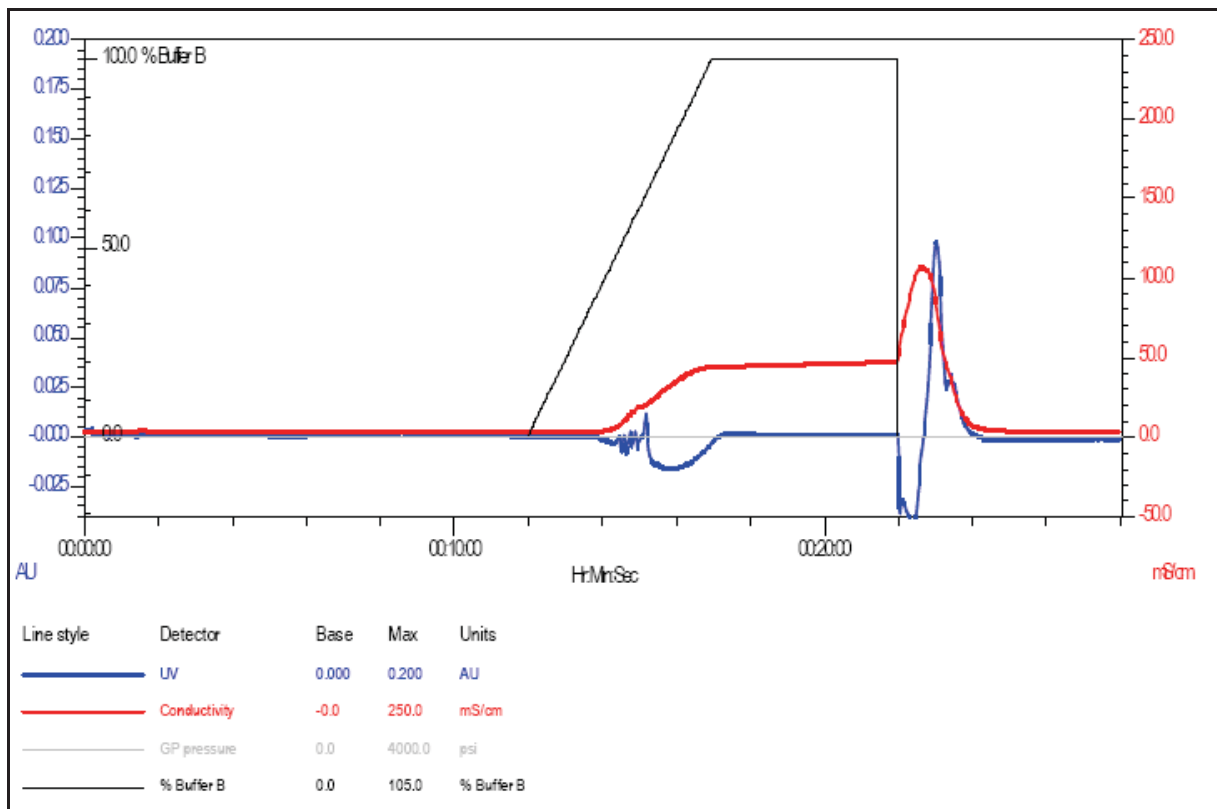


Abb. K-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E11 – 25% Ethylenglykol, 3 M KCl

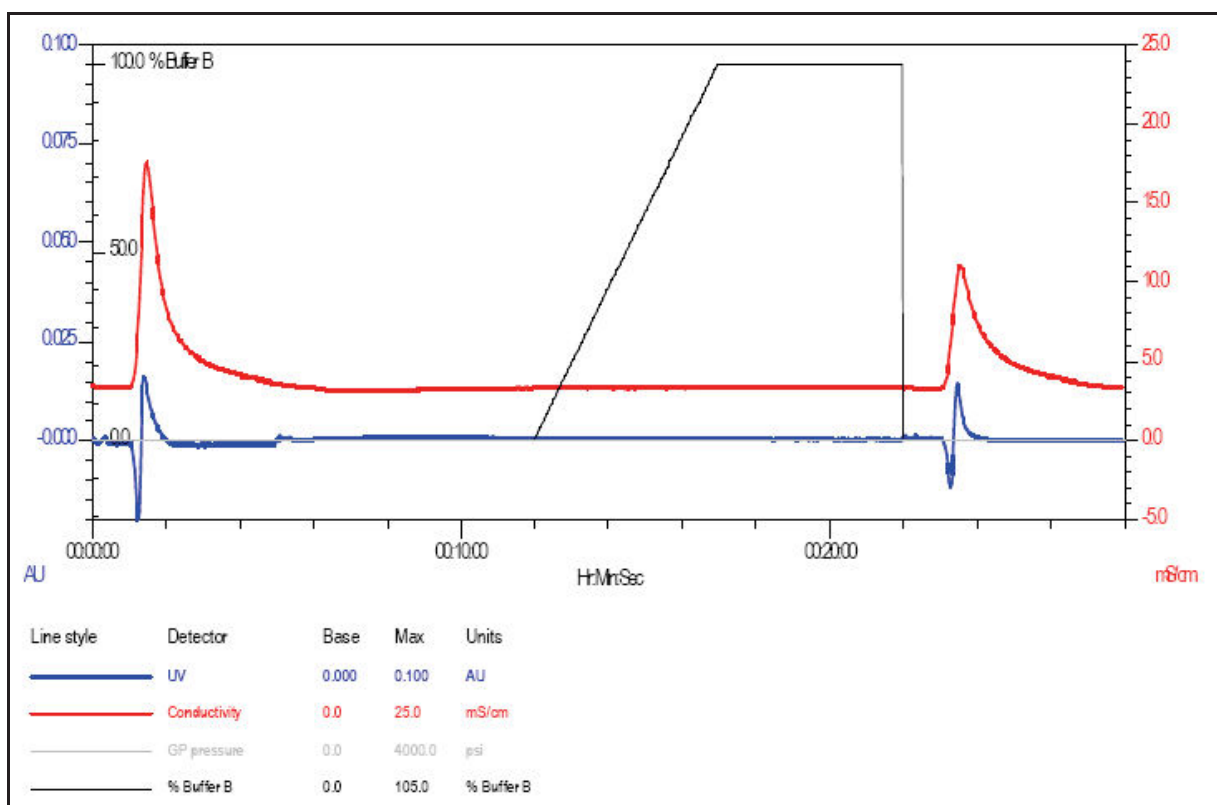


Abb. K-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E11 - 25% Ethylenglykol, 3 M KCl

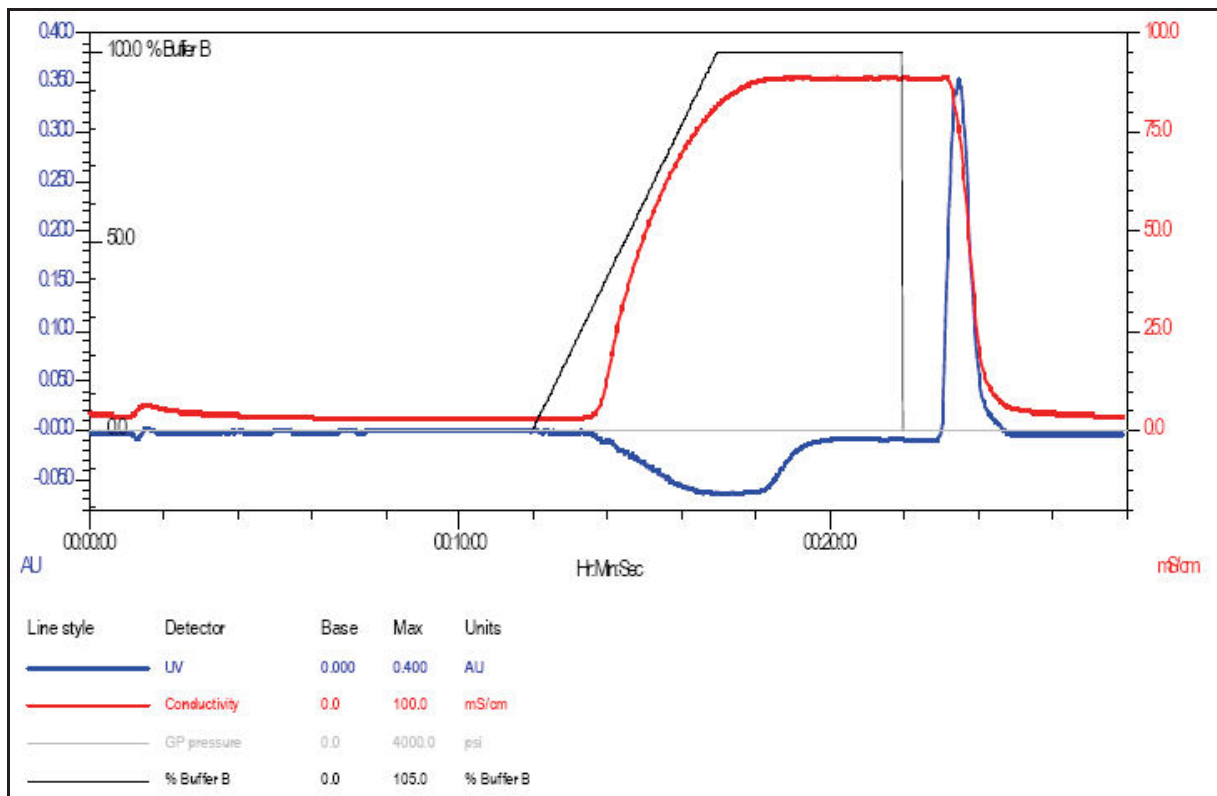


Abb. L-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel E12 – 25% Ethylenglykol, 2 M NaCl

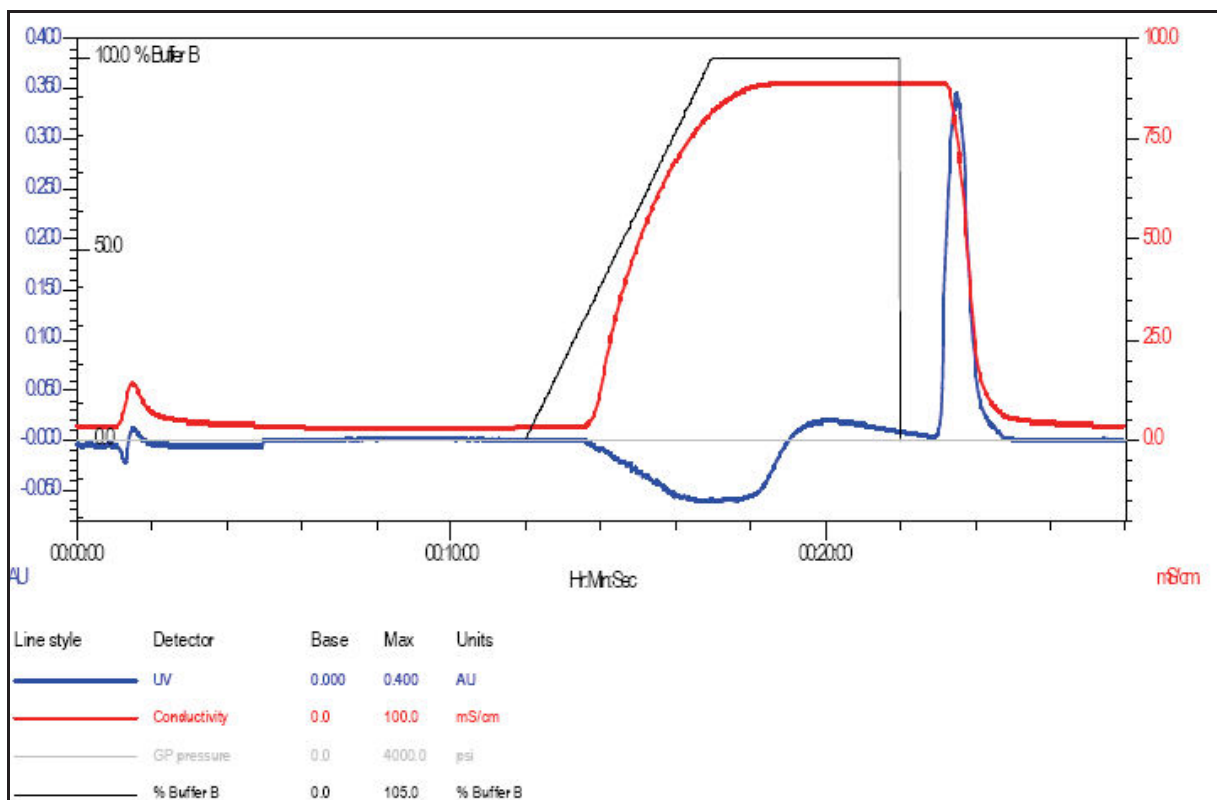


Abb. L-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel E12 - 25% Ethylenglykol, 2 M NaCl

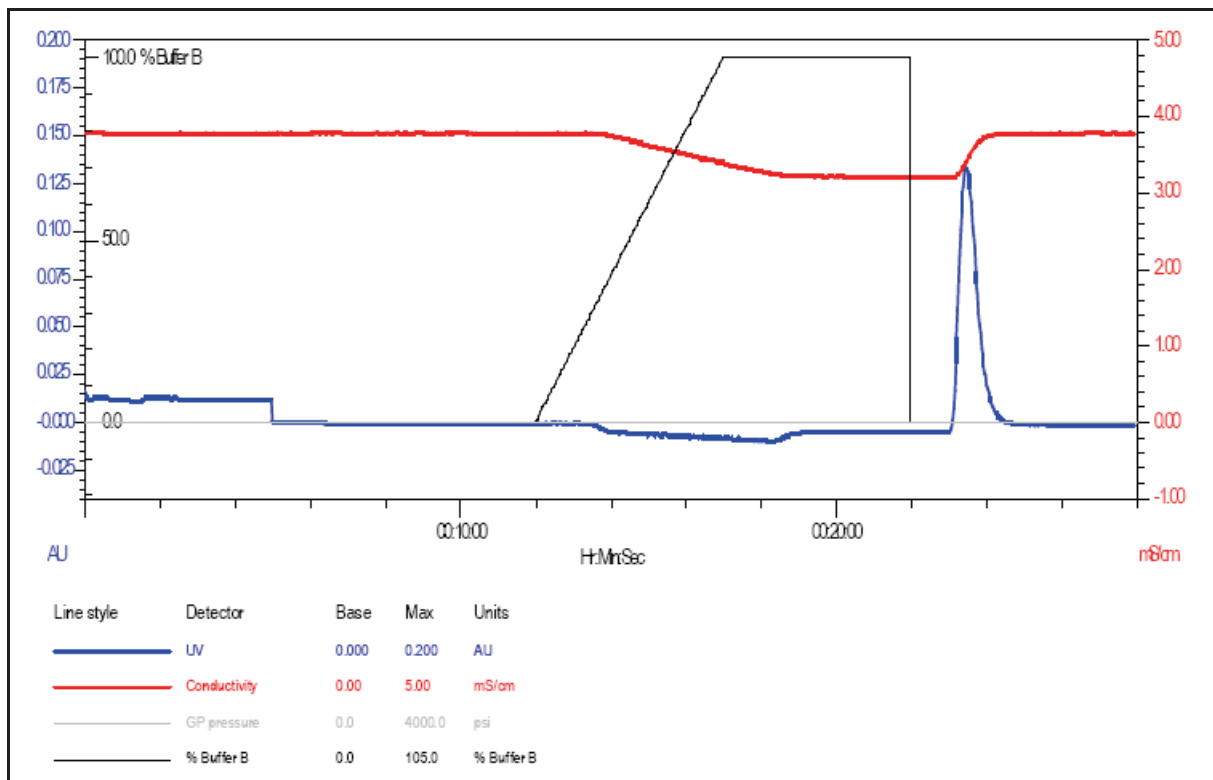


Abb. M-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel EV2 – 20 mM Borsäure pH 9.0, 2 M Urea

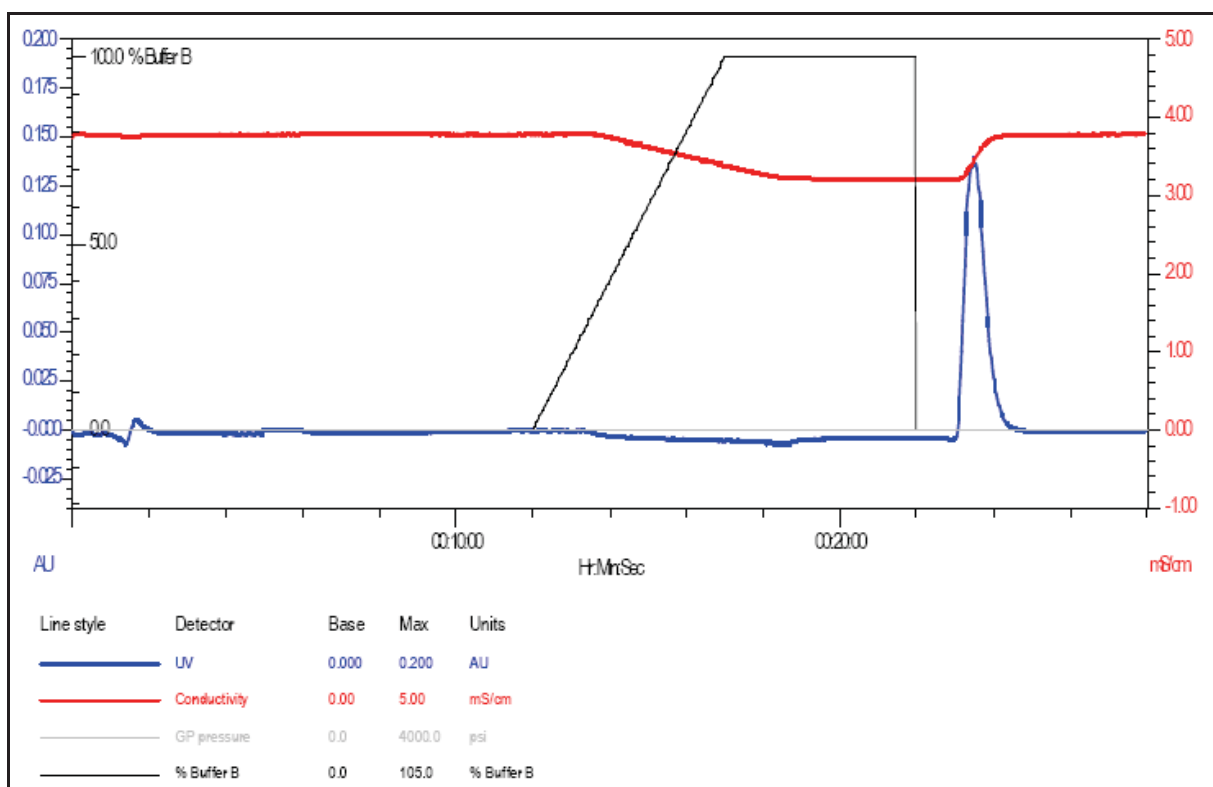


Abb. M-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel EV2 – 20 mM Borsäure pH 9.0, 2 M Urea

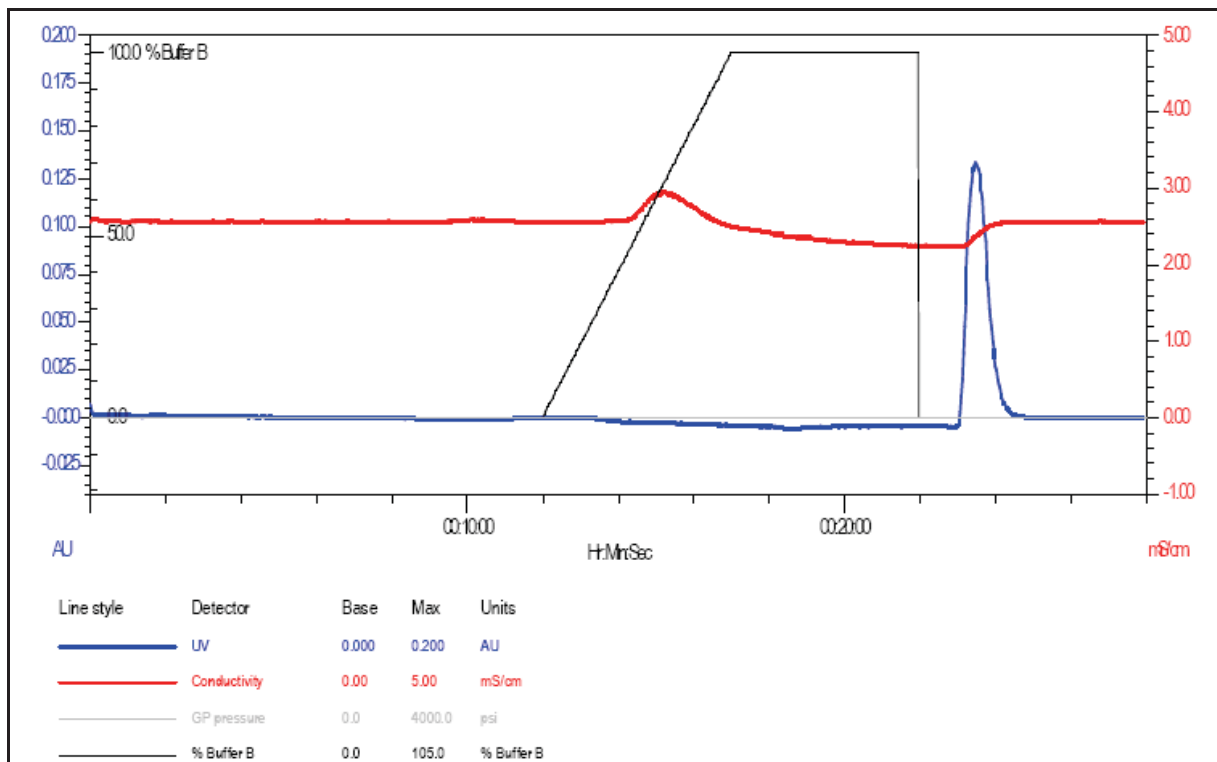


Abb. N-I: Leerlauf mit dem Elutionsmittel EV3 – 20 mM Natriumhydrogencarbonat pH 10.0, 2 M Urea

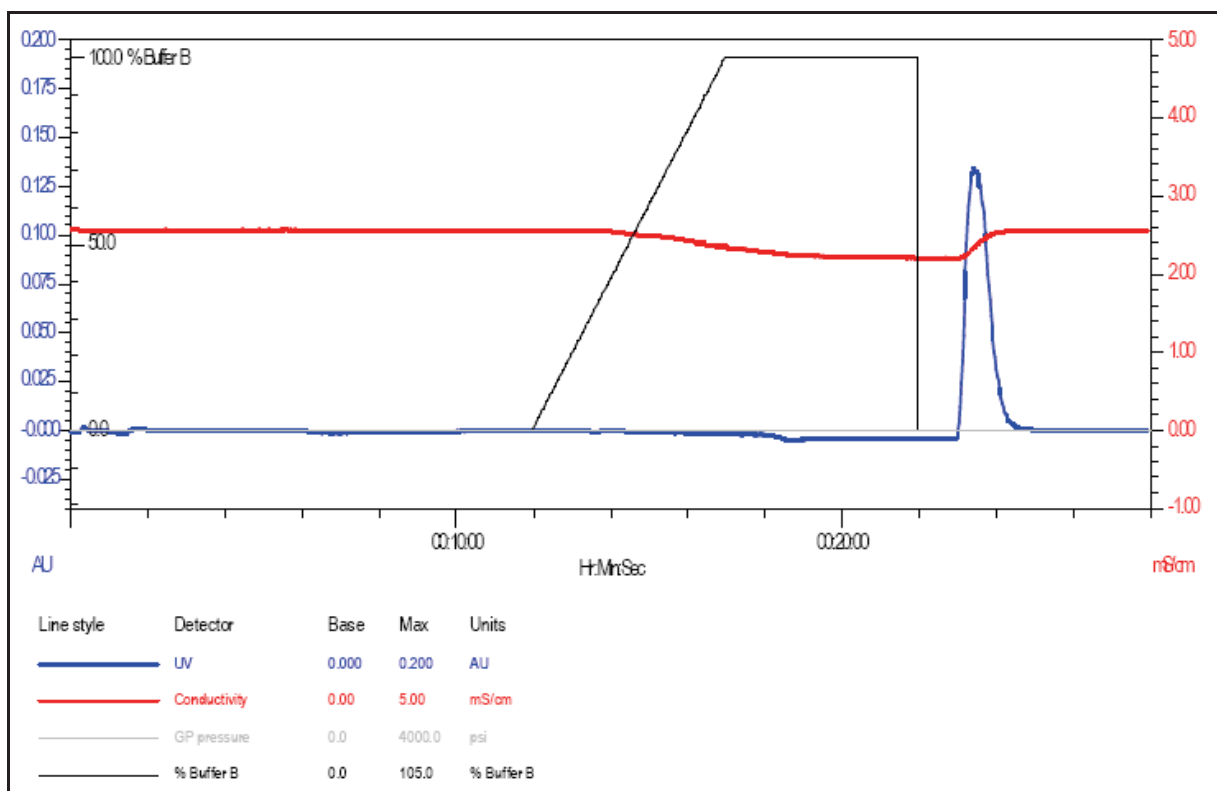


Abb. N-II: Probenlauf mit dem Elutionsmittel EV3 – 20 mM Natriumhydrogencarbonat pH 10.0, 2 M Urea

a Setup Valves:

	Inlet A	Inlet B	Sample Inject
Valve Type:	SV5-4 Valve	SV5-4 Valve	AVR7-3 Valve
Workstation Port:	1	2	4
Position 1:	50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl	Load Sample
Position 2:	A-Buffer 2	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-	Inject Sample
Position 3:	A-Buffer 3	1 M NaOH	Purge

b

Step Number	Start (ml)	Step
1	0.0	Turn (UV Detector) lamp ON
2	0.0	Isocratic Flow with 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl at 1.00 ml/min for 5.0 ml
3	5.0	UV Zero Baseline
4	5.0	Static Loop: Inject 5.0 ml sample at 1.00 ml/min for 5.0 min
5	10.0	Isocratic Flow with 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl at 1.00 ml/min for 5.0 ml
6	15.0	Linear Gradient with 0% to 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl at 1.00 ml/min for 5.0 ml
7	20.0	Isocratic Flow with 0% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl at 1.00 ml/min for 5.0 ml
8	25.0	Isocratic Flow with 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl at 1.00 ml/min for 5.0 ml
9	30.0	Change SV5-4 Valve - Inlet B Port 2 valve at port 2 to 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-HCl
10	30.0	UV Zero Baseline
11	30.0	Linear Gradient with 0% to 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-HCl at 1.00 ml/min for 5.0 ml
12	35.0	Isocratic Flow with 0% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-HCl at 1.00 ml/min for 5.0 ml
13	40.0	Isocratic Flow with 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M Guanidin-HCl at 1.00 ml/min for 5.0 ml
14	45.0	Change SV5-4 Valve - Inlet B Port 2 valve at port 2 to 1 M NaOH
15	45.0	UV Zero Baseline
16	45.0	Linear Gradient with 0% to 100% 1 M NaOH at 1.00 ml/min for 5.0 ml
17	50.0	Isocratic Flow with 0% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100% 1 M NaOH at 1.00 ml/min for 5.0 ml
18	55.0	Isocratic Flow with 100% 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0% 1 M NaOH at 1.00 ml/min for 5.0 ml
19	60.0	End of Protocol.

Abb. O-I: Auszug aus dem Methodenreport des chromatographischen Laufes Molke 1.1, a: Ventilbelegung, b: Protokoll

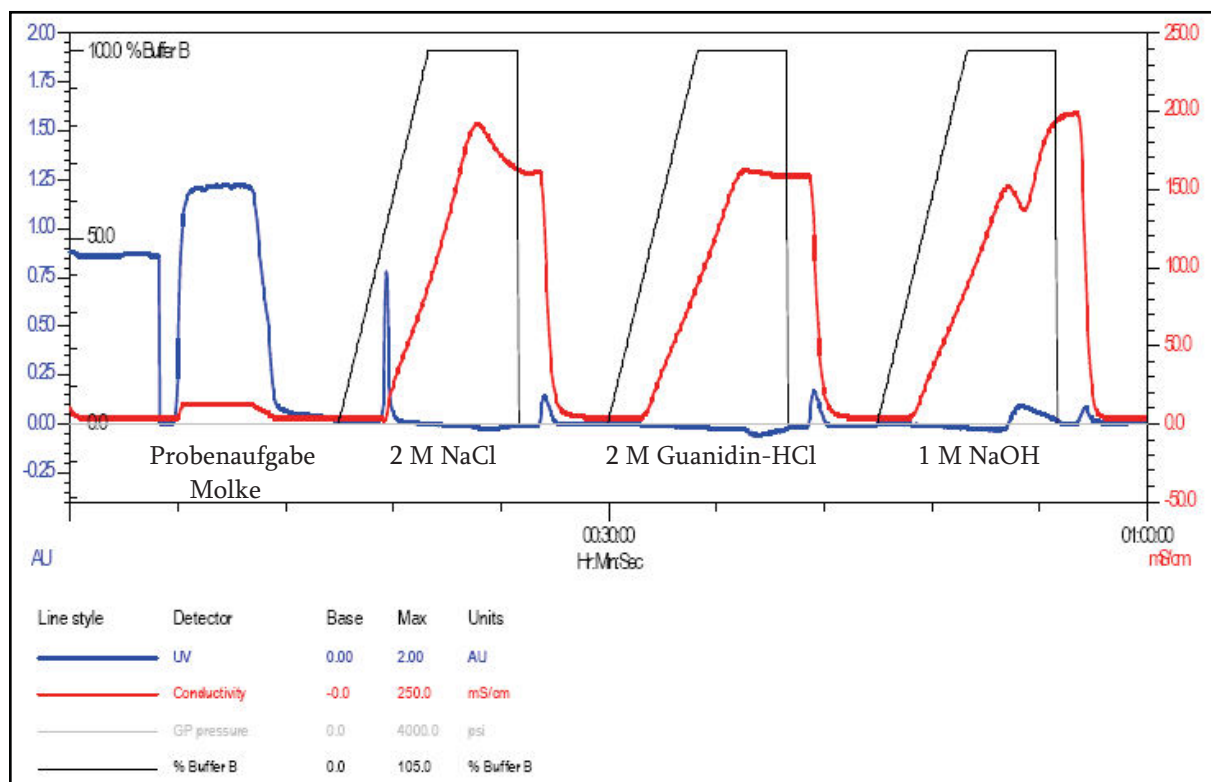


Abb. O-II: Chromatogramm des Laufes Molke 1.1

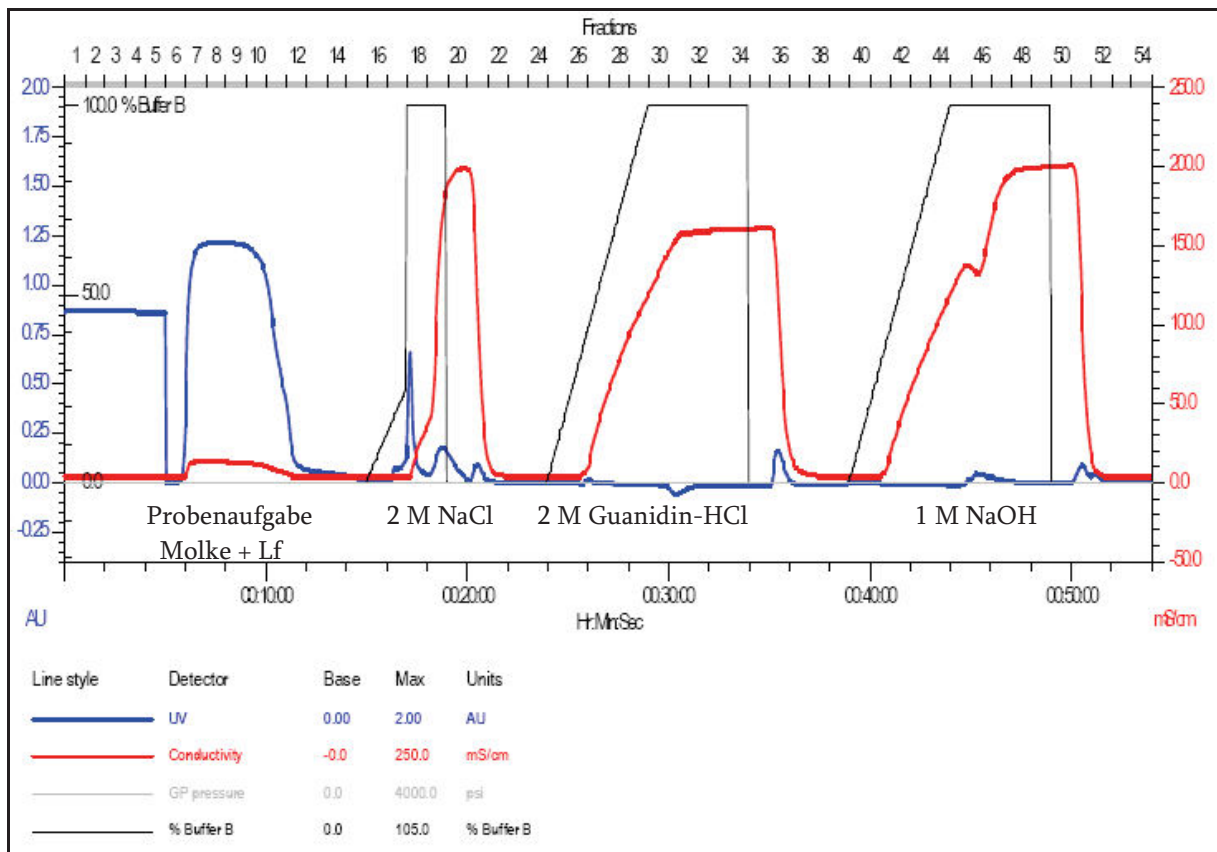


Abb. P-I: Chromatogramm des Laufes Molke 1.2

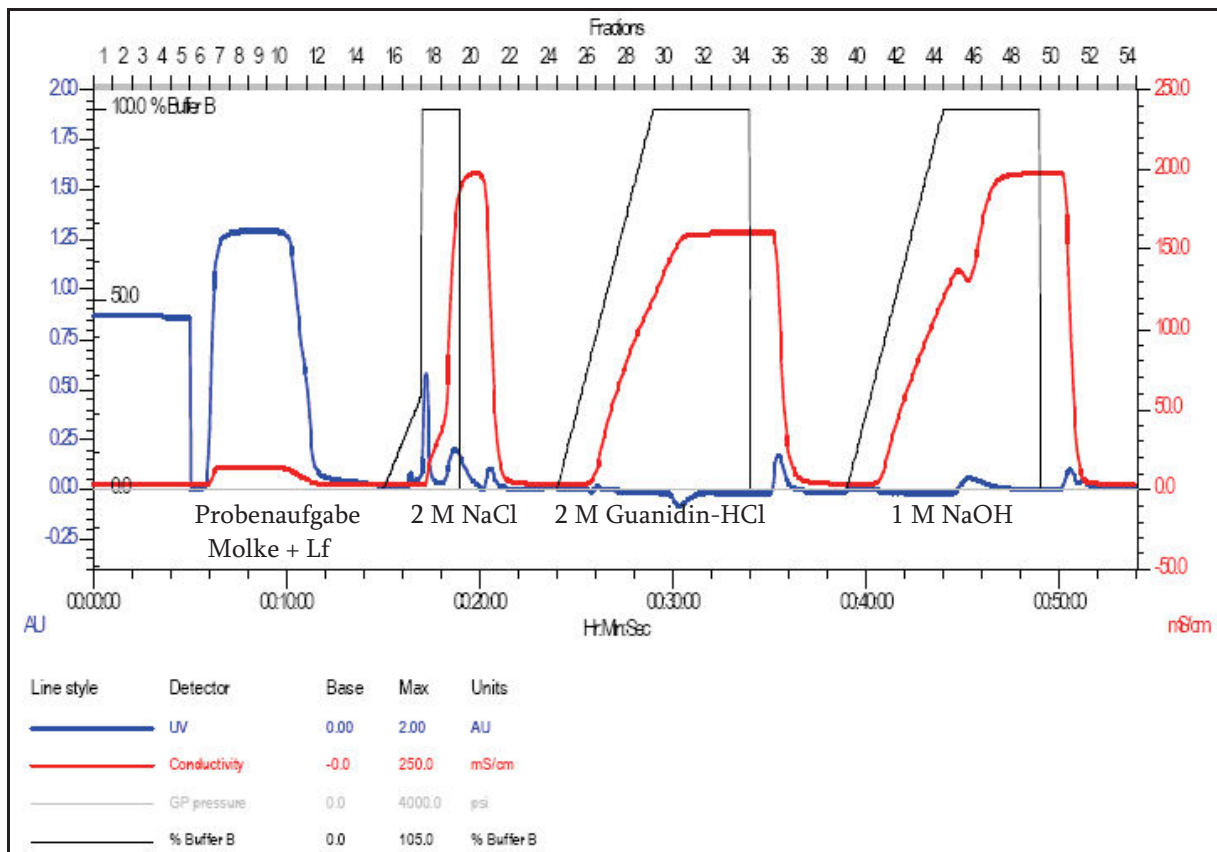


Abb. P-II: Chromatogramm des Laufes 2.1, Run 2

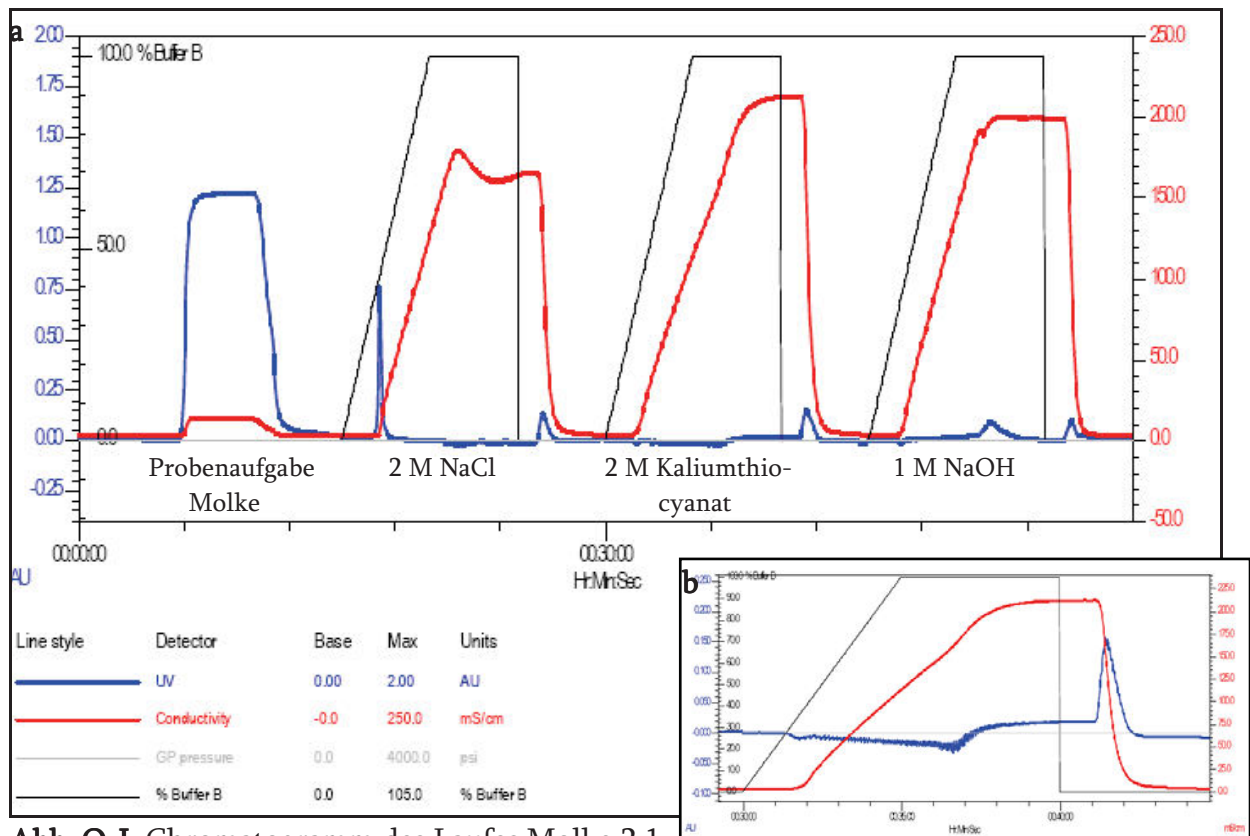


Abb. Q-I: Chromatogramm des Laufes Molke 2.1

a: gesamter Lauf, b: vergrößerte Darstellung des Elutionsbereiches

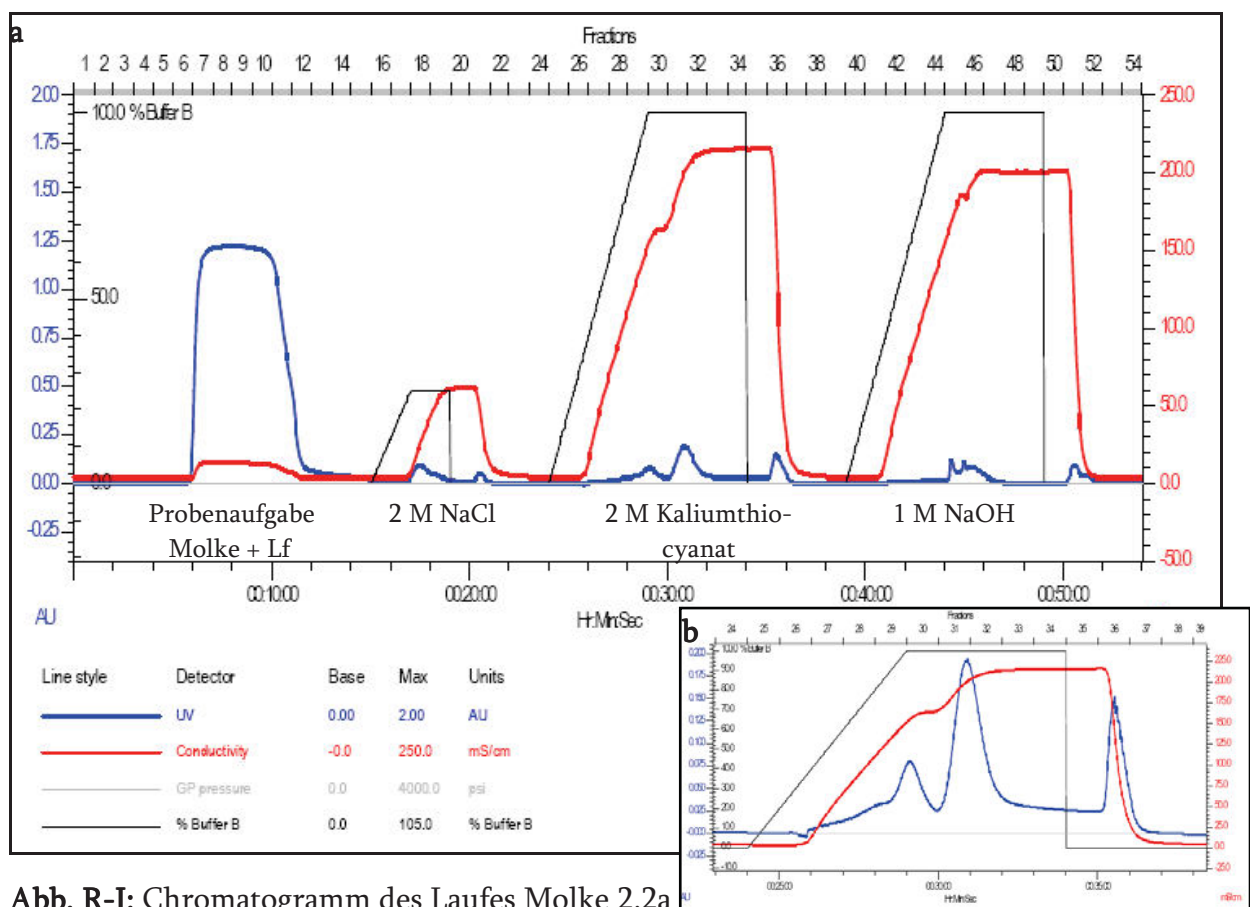
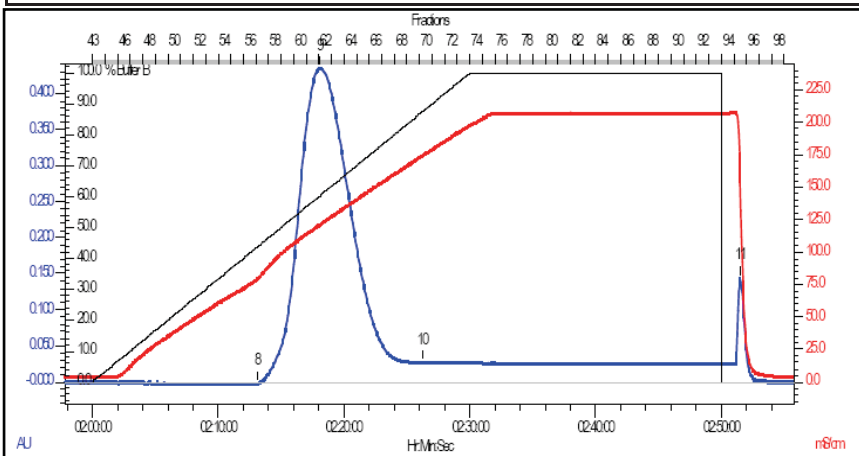
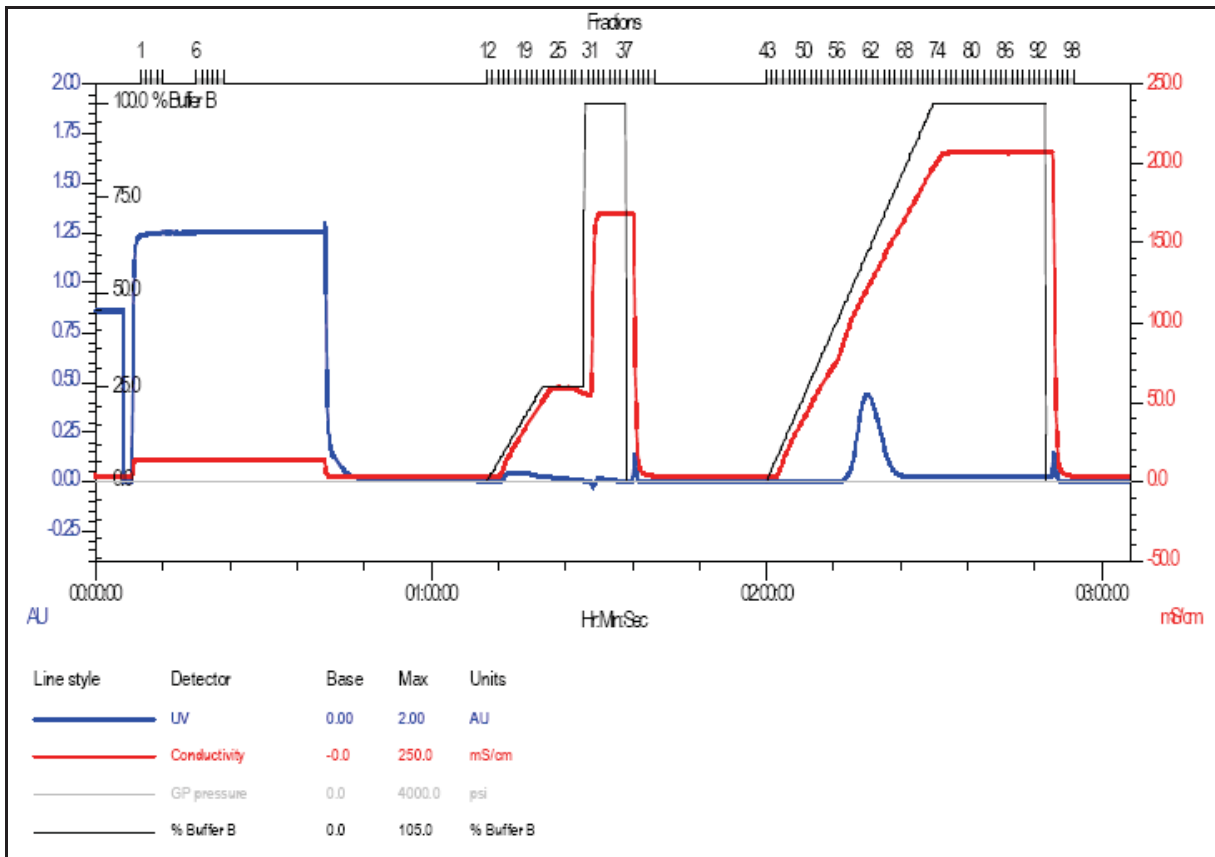


Abb. R-I: Chromatogramm des Laufes Molke 2.2a

a: gesamter Lauf, b: vergrößerte Darstellung des Elutionsbereiches



Tags for UV Trace

Time (h:m:s)	Volume (ml)	Buffer B (%B)	UV (AU)	Cond. (mS/cm)	GP Pres. (psi)
02:13:06	133.1	44	-0.00333	79.064	33.186
02:18:04	138.1	60	0.43400	120.658	33.717
02:26:14	146.2	87	0.02650	173.899	34.525
02:51:29	171.5	0	0.14241	143.187	32.729

Abb. R-II: Chromatogramm des Laufes Molke 2.2b, PV = 35 mL, a: gesamter Lauf, b: vergrößerte Darstellung des Elutionsbereiches, c: Variablen-tabelle von Tags

6.2 Desalting-Chromatogramme

Übersichtstabelle 3: Entsalzung der Fraktionen des Laufes Molke 2.2b, PV = 35 mL

Abschnitt	Fraktionenpool	Abbildungsnummer	
		PV = 5 mL // 2,5 mL/min	PV = 1 mL // 1 mL/min
Probenaufgabe	3-5 & 7-11	S-I	S-II
2 M NaCl	16-29	T-I	T-II
Elution	57-68	U-I	U-II

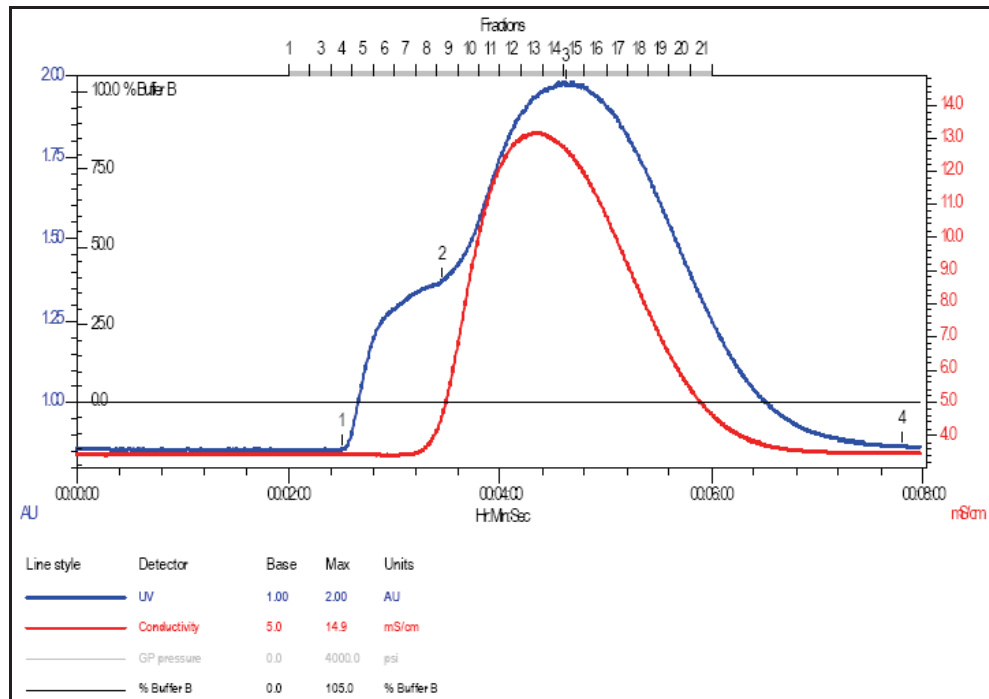


Abb. S-I: Entsalzung von 5 mL gepoolten Fraktionen der Probenaufgabe, 2,5 mL/min

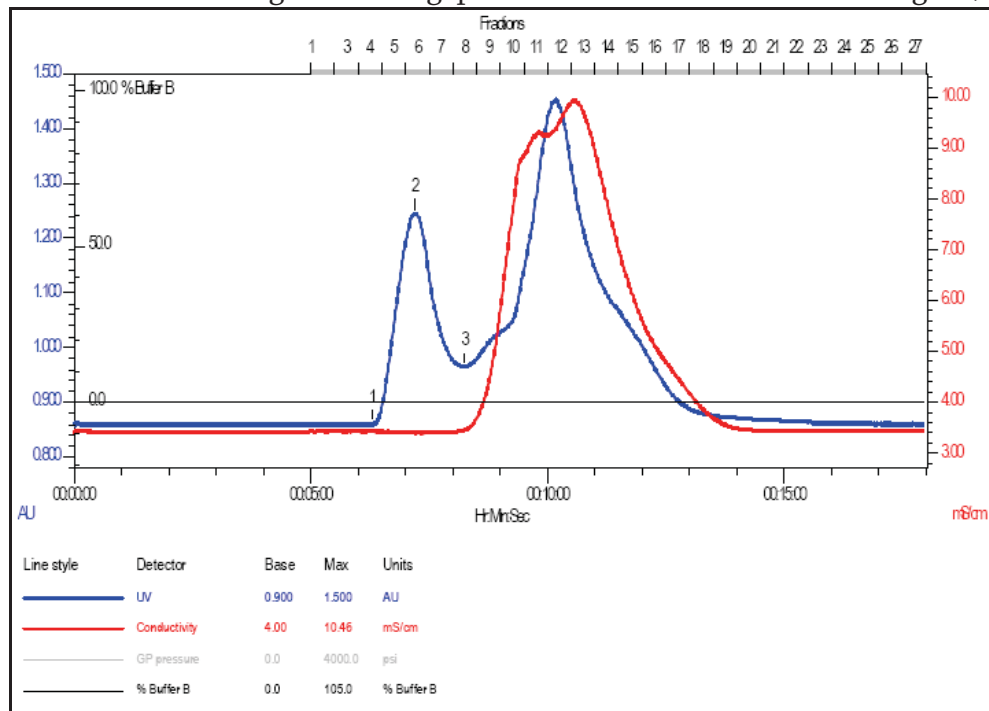


Abb. S-II: Entsalzung von 1 mL gepoolten Fraktionen der Probenaufgabe, 1 mL/min

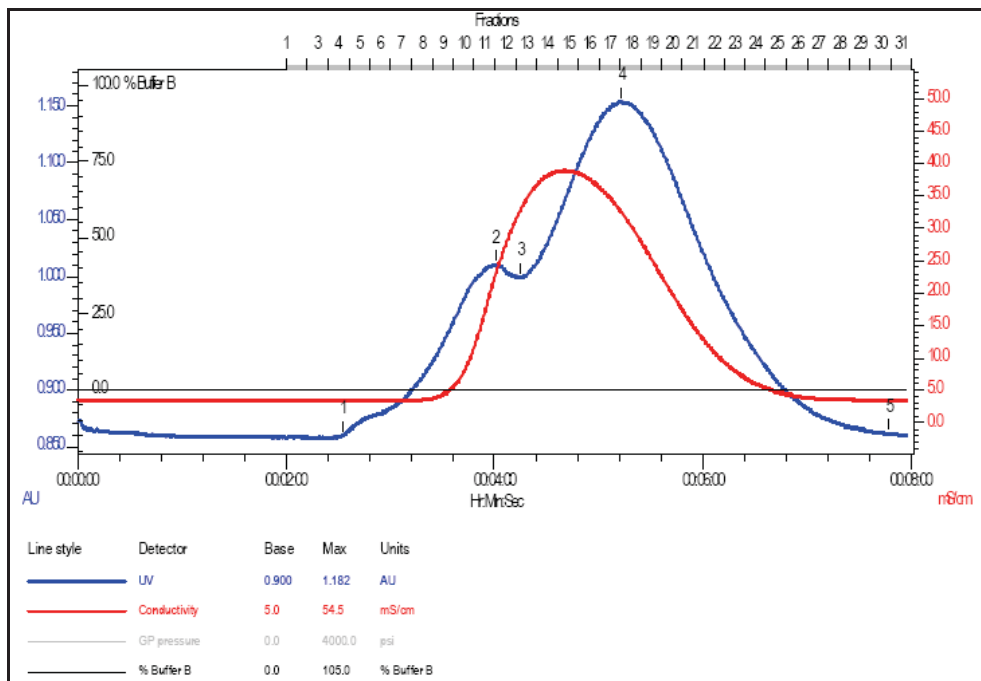


Abb. T-I: Entsalzung von 5 mL gepoolten Fraktionen der Vorelution mit 2 M NaCl, Flussrate: 2,5 mL/min

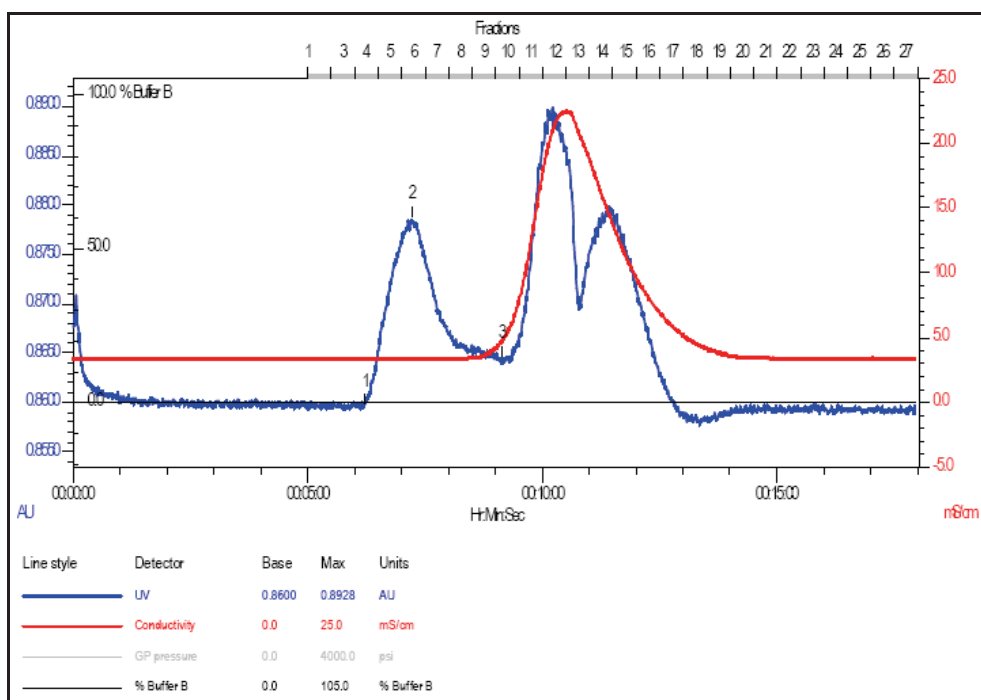


Abb. T-II: Entsalzung von 1 mL gepoolten Fraktionen der Vorelution mit 2 M NaCl, Flussrate: 1 mL/min

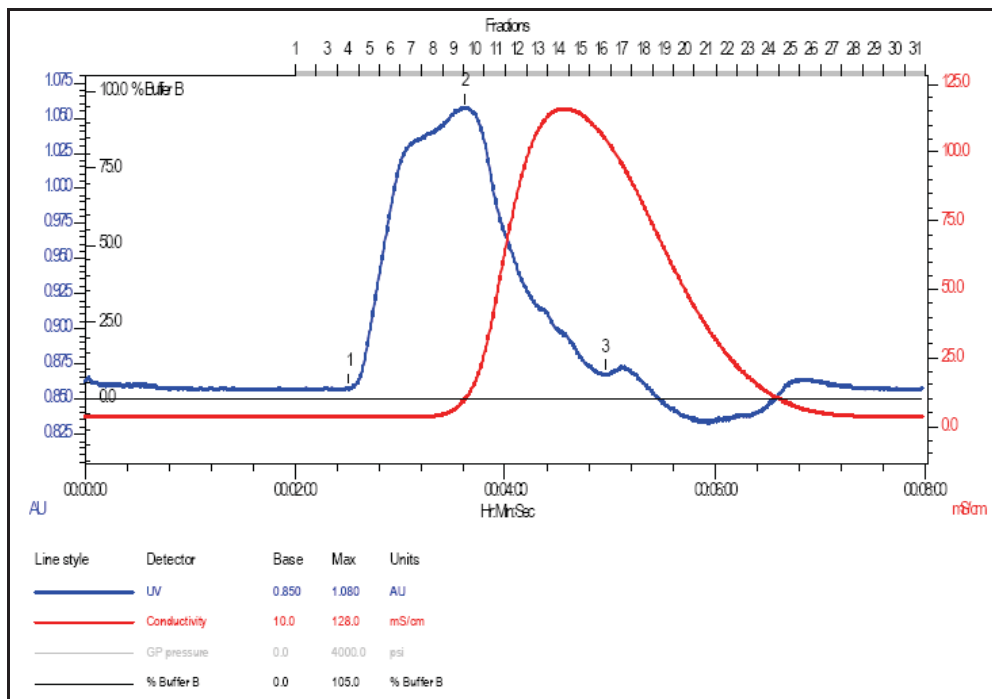


Abb. U-I: Entsalzung von 5 mL gepoolten Fraktionen der Elution mit 2 M Kaliumthiocyanat, Flussrate: 2,5 mL/min

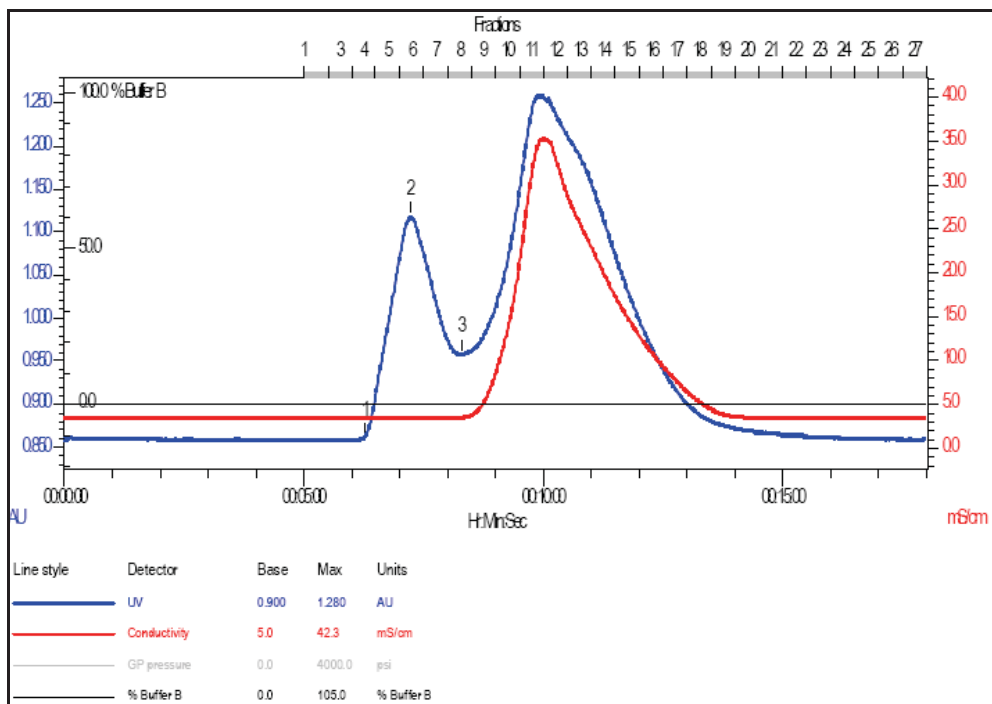


Abb. U-II: Entsalzung von 1 mL gepoolten Fraktionen der Elution mit 2 M Kaliumthiocyanat, Flussrate: 1 mL/min