



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Differenzierung von Weizensorten basierend auf
Proteinmustern mittels Kapillargelelektrophorese-am-
Chip“

Verfasserin

Angela Lehner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Wien, im Oktober 2010

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 419

Studienrichtung lt. Studienblatt: Chemie

Betreuer: Univ. Prof. Mag.pharm. Dr.rer.nat Günter Allmaier

„FRÜHER STARBEN DIE MENSCHEN MIT 35 JAHREN, HEUTE SCHIMPFFEN SIE BIS 95 AUF DIE
CHEMIE.“
Carl Heinrich Krauch (1931-2004)

Danksagung

Ich möchte mich bei Univ.-Prof. Dr. Günter Allmaier bedanken, der mir ermöglicht hat, an der Technischen Universität in seiner Arbeitsgruppe diese Diplomarbeit durchzuführen und bei Univ.-Ass. Dr. Martina Marchetti-Deschmann für die Betreuung meiner Arbeit.

Dr. Wolfgang Winkler danke ich dafür, dass er mir bei so vielen Gelegenheiten mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist. Mag. Stefan Bugovsky half mir viele softwarespezifische Probleme zu lösen.

Der gesamten Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die herzliche Aufnahme und die vielen Ratschläge, die mir im Verlauf meiner Arbeit sehr weitergeholfen haben.

Weiters gilt mein Dank der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, die diese Diplomarbeit finanziert hat. Besonders möchte ich hier DI Verena Peterseil, Mag. Rupert Hochegger und Dr. Friedrich Sövegarto dankend erwähnen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht haben, und bis zuletzt nicht die Geduld mit mir verloren haben.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
1.1. Weizen – Glutenin – Backqualität	5
1.2. Fragestellung.....	7
2. Grundlagen	8
2.1. Molekulargewichtsbestimmung.....	8
2.1.1. Elektrophorese	8
2.1.1.1. Grundlagen	8
2.1.1.2. Planare Gelelektrophorese	9
2.1.1.3. Kapillargelelektrophorese-am-Chip (CGE-am-Chip)	10
2.1.2. Massenspektrometrie	13
2.1.2.1. Grundlagen	13
2.1.2.2. Matrix-assisted Laserdesorption/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS).....	14
3. Experimentelles	16
3.1. Geräte	16
3.2. Materialien	17
3.3. Lösungen und Rezepturen.....	18
3.3.1. Probenvorbereitung	18
3.3.2. Planare Gelelektrophorese	18
3.3.2.1. Stammlösungen und Puffer.....	18
3.3.2.2. Gelelektrophorese – Methode Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen (UPOV)	20
3.3.2.3. Gelelektrophorese – Methode Lämmli	20
3.3.2.4. Gelelektrophorese – Methode Ethylenglycoldiacrylat (EDA)	21
3.3.3. Färbemethoden.....	21
3.3.3.1. Gelfärbemethoden - Coomassie-Brillant-Blau (CBB)	21
3.3.3.2. Gelfärbemethoden-Silberfärbung	22
3.3.3.3. Membranfärbemethoden	22
3.3.4. Extraktionsmethoden	23
3.3.4.1. Extraktionsmittel für gelimmobilisierte Proteine.....	23
3.3.4.2. Proteintransfer-Elektroblotten	24
3.3.4.3. Lösungsmittel / Extraktionsmittel für membranimmobilisierte Proteine.....	24

3.3.5.	Kapillargelelektrophorese-am-Chip -----	24
3.3.6.	MALDI-TOF-MS -----	25
3.3.6.1.	MALDI-Matrix -----	25
3.3.6.1.1.	MALDI-TOF-MS-Kalibrierstandards -----	25
3.4.	Probenmaterial -----	26
3.5.	Probenvorbereitung -----	27
3.5.1.	Extraktion -----	27
3.5.1.1.	Einstufige Extraktion -----	27
3.5.1.2.	Zweistufige Extraktion -----	27
3.5.2.	Lagerung -----	28
3.5.2.1.	Lagerstudie bei 4°C -----	28
3.5.2.2.	Frier-Auftau-Zyklen -----	29
3.5.3.	Proteinstandard für die planare Gelelektrophorese -----	29
3.6.	Gelelektrophorese -----	30
3.6.1.	UPOV-Standardmethode mit CBB-Färbung -----	30
3.6.1.1.	Gelherstellung -----	30
3.6.1.2.	Elektrophorese -----	30
3.6.1.3.	Fixieren und Färben -----	31
3.6.1.4.	Färben ohne fixieren -----	31
3.6.2.	Planare Gelelektrophorese (Lämmli und EDA) -----	31
3.6.2.1.	Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) Methode Lämmli -----	31
3.6.2.2.	SDS-PAGE Methode EDA -----	32
3.6.2.3.	Silberfärbung -----	32
3.6.3.	Extraktion aufgetrennter Proteine -----	33
3.6.3.1.	Extraktion aus Gelstücken (schütteln) -----	33
3.6.3.2.	Elektroelution -----	34
3.6.3.3.	Blotten, Extraktion aus Blotmembran -----	35
3.6.4.	Kapillargelelektrophorese-am-Chip -----	36
3.6.4.1.	Methode A -----	36
3.6.4.2.	Methode B -----	37
3.6.4.3.	Reproduzierbarkeit der Weizengluteninmessung mittels Methode A -----	38
3.7.	Massenspektrometrie -----	40
3.7.1.	Probenvorbereitung: Umkehr-Festphasenextraktion mit ZipTip Technologie -	40
3.7.2.	Probenpräparation MALDI-TOF-MS -----	41
3.7.3.	Kalibration -----	41
3.7.4.	Messbedingungen -----	42
3.8.	Statistische Methoden -----	43

3.8.1.	Hierarchische Clusteranalyse	43
3.8.2.	Hauptkomponentenanalyse	44
3.8.3.	Visuelle Zuordnung	44
4.	Ergebnisse und Diskussion	46
4.1.	Auswahl des Assaytyps und der Probenkonzentration	46
4.2.	Technische Reproduzierbarkeit	49
4.3.	Haltbarkeitsstudie des Probenmaterials	51
4.3.1.	Die Haltbarkeit der Weizenextrakte bei 4°C	51
4.3.2.	Haltbarkeit bei -20°C	58
4.4.	Kapillargelelektrophorese-am-Chip	65
4.4.1.	Reproduzierbarkeitsstudie	65
4.4.2.	Beobachtungen bei Methode A	67
4.5.	Vergleich der Elektrophorese von Weizenglutinen mittels SDS-PAGE und CGE-am-Chip	70
4.5.1.	Vergleich der Migrationsreihenfolge von SDS-PAGE und CGE-am-Chip	70
4.5.2.	Vergleich der Größenzuweisung von Weizenglutininbanden mittels SDS-PAGE und CGE-am-Chip	72
4.5.3.	Extraktion von Proteinbanden zwecks Charakterisierung	73
4.5.3.1.	Verschiedene Extraktionsmittel (CGE-am-Chip, MALDI MS)	73
4.5.3.2.	Elektroelution	77
4.5.3.3.	Elektroblotten	78
4.5.4.	Vergleich PAGE-Methoden bezüglich Extrahierbarkeit von Proteinen	79
4.5.4.1.	SDS-PAGE, UPOV	79
4.5.4.2.	SDS-PAGE, Lämmli	82
4.5.4.3.	EDA-haltige SDS-PAGE	85
4.6.	Vergleich der Extraktionsmethoden (Extraktion aus Weizenkörnern - 1- oder 2-stufig)	95
4.7.	Statistik	98
4.7.1.	Hierarchische Clusteranalyse	98
4.7.2.	Hauptkomponentenanalyse	99
4.7.3.	Visuelle Zuordnung	101
5.	Zusammenfassung	104
6.	Abstract	106
7.	Anhang	108
7.1.	Literaturverzeichnis	108
7.2.	Abbildungsverzeichnis	111
7.3.	Bildnachweis	115
7.4.	Tabellenverzeichnis	116

7.5. Abkürzungen-----	118
Curriculum Vitae -----	120

1. EINLEITUNG

1.1.WEIZEN – GLUTENIN – BACKQUALITÄT

Weizen (*Triticum*) zählt zu den bedeutendsten Kulturpflanzen – weltweit wie auch in Österreich war er im Jahr 2008 die zweitmeist angebaute Getreideart nach Mais. Die Jahresproduktion von Weizen in Tonnen beträgt 670 Mio. weltweit, davon 1,7 Mio. in Österreich.¹

Man unterscheidet die Sorten der Einkornreihe (diploid), die Emmerreihe (tetraploid) und jene der Dinkelreihe (hexaploid)². Von wirtschaftlicher Bedeutung sind vor allem der hexaploide Weich-, Saat- oder Brotweizen (*Triticum aestivum*) und der tetraploide Hartweizen (*Triticum durum*).³ Weichweizen wird vor allem in der Brotherstellung und als Futtermittel verwendet, Hartweizen in der Erzeugung von Teigwaren³.

Auch wenn der Eiweißgehalt im Weizenkorn mit 10,6 % eher gering ist⁴, so wird aufgrund der hohen verzehrten Mengen in Deutschland 30 % des Eiweißbedarfs durch Brot gedeckt.³

Im Getreide enthaltene Proteine werden nach T.B. Osborne in vier Gruppen gemäß ihrer Löslichkeit eingeteilt:⁵

Osborne Fraktionen:

- Albumine: mit Wasser extrahierbar, bleiben an ihrem isoelektrischen Punkt in Lösung
- Globuline: mit Kochsalzlösung (0,4 mol/L) extrahierbar
- Prolamine: mit 70 % (v/v) Ethanol (EtOH) extrahierbar (Anmerkung: restliche 30 % wahrscheinlich Wasser, ist in der Literaturstelle nicht exakt formuliert)
- Gluteline: Ohne Zugabe von Reduktionsmitteln nicht extrahierbar.

Die Osborne-Fraktionen haben bei unterschiedlichen Getreidearten spezielle Namen, im Falle von Weizen sind das:⁶

- Albumine: Leukosin
- Globuline: Edesin
- Prolamine: Gliadin
- Gluteline: Glutenin

Gluteline und Gliadine bilden zusammen nahezu 80 % der gesamten Weizenproteine.⁶

Weichweizen besteht aus drei doppelten Sätzen von je sieben Chromosomen, also $3 \times 2 \times 7 = 42$ Chromosomen, die AA, BB und DD benannt sind. Da die Chromosomen AA, BB und DD aus entwicklungsgeschichtlich sehr nahe verwandten Gräser-Genomen stammen, sind sich die Chromosomen einer Gruppe, z.B. A1, B1 und D1, sehr ähnlich, „homöolog“ (während z.B. die Chromosomen A1 und A1 zueinander homolog sind). Bei vollständigem Chromosomensatz sind demnach alle Gene in sechsfacher Ausführung vorhanden.²

Glutenine werden in High Molecular Weight-Gluteninuntereinheiten (HMW-GUE) und Low Molecular Weight-Gluteninuntereinheiten (LMW-GUE) unterschieden. Jene Gene, die HMW-GUE kontrollieren, sind am langen Schenkel der Chromosomen A1, B1 und D1 lokalisiert. Die Genloci werden Glu-A1, Glu-B1 und Glu-D1 bezeichnet.⁷ Jeder Locus besteht aus jeweils zwei Genen, die für eine x- und eine y-Einheit codieren und für die eine Reihe unterschiedlicher Allele bekannt sind. Die zugehörigen Proteine liefern bei Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) der Weizenkornextrakte ein charakteristisches Bandenmuster – meist treten charakteristische Banden paarweise auf.^{8, 9}

Zur Zeit wird in weltweiter Kooperation an der Sequenzierung des gesamten Weizengenoms und der Erstellung physikalischer Genkarten gearbeitet.¹⁰

Für die Brotbackqualität macht man vor allem Gliadin (Dehnbarkeit) und Glutenin (Elastik) verantwortlich. Unter dem Begriff „Brotbackqualität“ versteht man die Verarbeitungsqualität von Weizenmehlen, die die Teig- und Broteigenschaften beinhalten. Sie wird durch Messung verschiedener physikalischer Parameter wie Extensibilität, Elastizität und Viskosität des Teiges bestimmt.¹¹ Da dazu verwendete Testmethoden wie z.B. der Sedimentationstest nach Zeleny¹² große Mengen an Kornmaterial benötigen, wurde versucht Modelle zu entwickeln, mit deren Hilfe durch Untersuchung einzelner Körner Voraussagen über die zu erwartende Backqualität getroffen werden können. HMW-GUE und Gliadinallelen wurden verschiedene Zahlenwerte (Scores) zugewiesen. Während im Modell nach Payne¹³ alleine den HMW-GUE Bedeutung zugesprochen wurde, bewertete das Modell nach Cerny¹⁴ den Beitrag der Gliadine höher als jenen der Glutenine. In den heute zulässigen Lebensmitteltestverfahren⁸ werden häufig gelelektrophoretische Testmethoden (SDS-PAGE) eingesetzt. Die dabei detektierten HMW-GUE- und Gliadinbanden sind jedoch laut Lelley et al. ¹⁵ keineswegs eine hinreichende Bedingung für gute Qualität sondern nur ein Hinweis, dass gute Brotbackqualität möglich wäre. Wichtig ist es zu bedenken, dass die Zusammensetzung der Glutenine von deren Genetik determiniert wird, während die Quantität von Umweltbedingungen, und damit äußeren Einflüssen, abhängt.

Die Methode der SDS-PAGE von Extrakten von Weizenkörnern wird nicht nur zur Voraussage der Backqualität eingesetzt, sondern findet auch zur Untersuchung der Homogenität von Zuchtstämmen und zur Sortenidentifizierung Verwendung. Hierfür werden jeweils einzelne Weizenkörner mit einer detergenzhaltigen Extraktionslösung versetzt, wie in Kapitel 3.5.1.1 näher beschrieben, und diese Einzelkornextrakte jeweils in eine Geltasche einer planaren SDS-PAGE aufgetragen (Kapitel 3.6) „Die Identifizierung der Sorten erfolgt durch Vergleich der Elektropherogramme von Probe und gleichzeitig aufgetrennter Vergleichssorte.“¹⁶

1.2.FRAGESTELLUNG

Die Untersuchung der GUE von Weizeneinzelkörnern durch SDS-PAGE ist eine wohletablierte Methode⁸ und wird in der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) regelmäßig durchgeführt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte untersucht werden, in wie weit diese Untersuchung auf eine Kapillargelelektrophorese-am-Chip mit laserinduzierter Fluoreszenz-Detektion (CGE-am-Chip mit LIF Detektion) übertragbar ist.

Proteinmuster von ausgewählten Weizensorten, bestimmt mit SDS-PAGE und CGE-am-Chip sollten miteinander verglichen werden und eine Differenzierung der Weizensorten durch Einzelkörner mit CGE-am-Chip versucht werden.

Weiters sollten die Möglichkeiten untersucht werden, die Ergebnisse statistisch zu erfassen und automatisch auszuwerten.

2. GRUNDLAGEN¹⁷

2.1. MOLEKULARGEWICHTSBESTIMMUNG

2.1.1. ELEKTROPHORESE

2.1.1.1. GRUNDLAGEN

Bei der Elektrophorese werden Teilchen aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld getrennt. Auf ein geladenes Teilchen wirkt einerseits die beschleunigende Kraft F_E (q...Ladung, E... elektrische Feldstärke)

$$\vec{F}_E = q * \vec{E} \text{ Warum verwenden sie Stern* anstatt } \times \text{ aus Symbolliste?}$$

Ihr entgegengesetzt wirkt die Reibungskraft F_R – für kugelförmige Teilchen ergibt sich aus dem Gesetz von Stokes (η ...Viskosität, r...Teilchenradius)

$$\vec{F}_R = 6 * \pi * \eta * r * \vec{v}$$

Nach einer kurzen Beschleunigungsphase stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Kräften ein, sodass sich das Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit \vec{v} bewegt.

$$\vec{F}_E = \vec{F}_R; \quad \vec{v} = \frac{q * \vec{E}}{6 * \pi * \eta * r}$$

Durch Zusammenfassung aller Konstanten (z.B. Ladung, Teilchenradius, Viskosität) erhält man die Mobilität u . Die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen ist somit allein von der Feldstärke abhängig.

$$\vec{v} = u * \vec{E}$$

Für nicht kugelsymmetrische Teilchen wie Proteine ist das Stokes'sche Gesetz jedoch nicht anwendbar, es kann jedoch ein empirischer Zusammenhang zwischen der Molekülmasse M und der Mobilität angegeben werden.

$$u \approx \frac{q}{M^{2/3}}$$

Geladene Teilchen werden gemäß der Debye-Hückel-Theorie von einer Wolke entgegengesetzt geladener Teilchen umgeben, dies führt mit steigender Ionenstärke zu einer steigenden Abschirmung, sodass nicht die gesamte Feldstärke auf das Teilchen einwirken kann.

Liegt das Teilchen nicht vollständig dissoziiert vor, so ist die Mobilität vom Dissoziationsgrad abhängig, die effektive Mobilität u_{eff} ergibt sich aus

$$u_{\text{eff}} = \sum_i (\alpha_i * u_i)$$

Weiters von Bedeutung ist der elektroosmotische Fluss (EOF) des Lösungsmittel, der sich durch Impulsübertragung aus der elektrochemischen Doppelschicht an der Grenzfläche zwischen

Elektrolytlösung und den meisten Träger- bzw. Kapillarmaterialien bei Anlegen einer elektrischen Spannung ergibt. (ϵ ...Dielektrizitätskonstante der Doppelschicht, ζ ...Zeta-Potential)

$$\vec{v}_{EOF} = \frac{\epsilon * \zeta * \vec{E}}{4 * \pi * \eta}$$

In der Elektrophorese kann der EOF je nach Messaufbau gleichgerichtet mit der Analytbewegung im elektrischen Feld sein, die Elektrophorese beschleunigen und bewirken, dass auch ungeladene Teilchen zum Detektor transportiert werden oder ihr entgegengesetzt sein.

Bei der SDS-PAGE (negativ geladene Proteine werden zur Anode beschleunigt) wirkt der EOF gegen die Wanderrichtung der Analyten, wird Elektrodenosmose bezeichnet und führt zu Verzerrung und Verdünnung der Proteinbanden. Durch Verwendung ladungsfreier Materialien und Trennmedien wird versucht die Elektrodenosmose möglichst gering zu halten.

2.1.1.2. PLANARE GELELEKTROPHORESE

Bei der Gelelektrophorese wandern die Analytmoleküle durch ein poröses Gel. Als ladungsfreies Gelmedium kommt z.B. Polyacrylamid (PA) zum Einsatz. Es wird durch Copolymerisation von Acrylamid (AA)-Monomer und einem Quervernetzter, meist N,N'-Methylenbisacrylamid (BisAA), erzeugt und durch die Totalacrylamidkonzentration %T und den Vernetzungsgrad %C charakterisiert.

$$\%T = \frac{(g AA + g BisAA) * 100}{pro 100 mL} \quad \%C = \frac{g BisAA * 100}{g AA + g BisAA}$$

PA Gele können unterschiedliche Dimensionen haben. Meist sind diese 1-1,5mm dick und zwischen 6 und 24 cm lang bzw. breit.

Im Falle der SDS-PAGE werden die Analyten (Proteine) vor der Elektrophorese mit einem Überschuss an SDS (ein anionisches Detergenz) erhitzt. SDS lagert sich proportional zur Molekülgröße an das Protein an (1,4g SDS / g Protein) und führt zu einer Denaturierung der Proteine, durch Zusatz von Reduktionsmittel werden außerdem die Disulfidbrücken gespalten. Die Mizellenbildung mit SDS stellt einheitliches Masse-zu-Ladungszahlverhältnis (m/z) her und hat zur Folge, dass die Proteine-SDS-Mizellen im Gel nach ihrer Größe gesiebt werden: Die Ladung der Proteine und damit auch ihre Wandergeschwindigkeit während der Elektrophorese hängt allein von ihrer Beladung mit SDS, also von der Molekülgröße ab.

Um die Aggregation von Proteinen beim Eintritt ins Gel zu verhindern, und um die gelelektrophoretische Auflösung zu erhöhen, wird die SDS-PAGE als diskontinuierliche Elektrophorese, d.h. mit diskontinuierlichem Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-HCl/TRIS-Glycin-Puffersystem, durchgeführt. Dabei wird ein engporiges Trenngel mit pH 8,8 mit

einem weiterporigen Sammelgel mit pH 6,8 kombiniert. Der isoelektrische Punkt von Glycin liegt nahe von pH 6,8; somit kommt es im Sammelgel zu einem isotachophoretischen Effekt, bei dem Glycin als langsam wanderndes Folgeion und Chlorid (aus der Salzsäure) als rasch wanderndes Leitton dient. Durch den intermediär entstandenen Feldstärkegradienten wandern die SDS-Protein-Mizellen als sich selbst fokussierender Stapel identer Mobilität, durch das Sammelgel. An der Grenze zum engermaschigen Trenngel bricht dieser Feldstärkegradient durch die nun erhöhte Mobilität des Glycins zusammen (der Wechsel des pH Wertes führt zu einer negativen Ladung am Glycin) und die SDS-Protein-Mizellen wandern mit einer ihrer Molekülgröße entsprechenden Geschwindigkeit durch das Trenngel.

Bei der SDS-PAGE besteht innerhalb eines gewissen Bereichs ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Molekülmasse und der Wanderungsstrecke der SDS-Protein-Mizellen. Mit Hilfe von Standardproteinen bekannter Molekülmasse, die am selben Gel aufgetragen werden, lässt sich das Molekulargewicht mit gewisser Genauigkeit bestimmen.

Die Detektion von Proteinen am Gel kann unter anderem durch reversible Anlagerung des Farbstoffs CBB (Nachweisgrenzenbereich 100 ng -1 µg) oder durch die empfindlichere, irreversible Silberfärbung (Nachweisgrenzenbereich 0,1 ng -1 ng)¹⁸ erfolgen.

Bei der SDS-PAGE können Proteine von ca. 15 Kilodalton (kDa) bis 200 kDa gut getrennt als auch detektiert werden.

2.1.1.3. KAPILLARGELELEKTROPHORESE-AM-CHIP (CGE-AM-CHIP)

KAPILLARELEKTROPHORESE

Das Aufbauprinzip einer konventionellen Kapillarelektrophorese ist sehr simpel. Eine dünne Kapillare (übliche Innendurchmesser 50 – 100 µm), die mit einem Elektrolyt gefüllt ist, taucht an beiden Enden in Pufferreservoirs. In diese Reservoirs tauchen zusätzlich zwei Elektroden, an denen eine hohe Spannung angelegt ist. An einem Ende der Kapillare werden die zu trennenden Proben eingebracht, am anderen Ende erfolgt die Detektion (üblicherweise Leitfähigkeits-, UV oder (laserinduzierte) Fluoreszenz-Detektor). Entsprechend ihrer Mobilität und der angelegten Spannungen bewegen sich die Moleküle unterschiedlich schnell durch das Trennsystem wodurch es zu Separation selbiger kommt.

KAPILLARGELELEKTROPHORESE

Bei der CGE wird in eine Kapillare zusätzlich zum Elektrolyten ein Gel eingebracht. Analog zu 2.1.1.2 können auch bei der CGE Proteine nach ihrer Größe getrennt werden. Aufgrund des sehr unterschiedlichen Aufbaus, vor allem der Miniaturisierung der Trennkanäle (Kapillare *versus* planares Gel), ergeben sich jedoch etliche Unterschiede.

Das Trenngel kann auch unvernetzt eingesetzt werden – die linearen Polymerketten bilden nur ein loses Geflecht. Eine Quervernetzung könnte sogar hinderlich sein, da eine Vernetzung eine höhere Querschnittsdichte bedeutet, wodurch die Kapillaren beim Durchgang voluminöser Analyten (z.B. Proteine) verstopfen können. Jedoch wird aufgrund der kleinen Innendurchmesser der Kapillaren weit weniger Probenmaterial benötigt.

Der Abtransport von während der Elektrophorese entstehender Wärme ist wesentlich effizienter, wodurch die Feldstärke stark, bis zu einem Faktor 10, erhöht werden kann. Dies führt zu kürzeren Analysezeiten für die Einzelmessungen.

Im Unterschied zur planaren Gelelektrophorese kann jedoch in einer Kapillare immer nur eine Probe aufgetrennt werden. Präparatives Trennen der Proteine ist jedoch nicht oder nur sehr bedingt möglich (z.B: Kapillarbündel).

Die Migrationszeit ist von der Molekülmasse der SDS-Proteinkomplexe abhängig - der lineare Bereich erstreckt sich bei Routinemethoden von ca. 15 bis 200 kDa.

KAPILLARGELELEKTROPHORESE-AM-CHIP¹⁹

CGE kann soweit miniaturisiert werden, dass sie auf einem Glas oder Polymerchip durchgeführt werden. In Abb. 1 ist das Chipdesign eines kommerziell erhältlichen CGE-Chips gezeigt (Agilent Technologies, gefertigt durch Caliper Life Sciences). In der Mitte befindet sich der 1,25 cm lange Separationskanal, in die 10 umgebenden Öffnungen werden die zu analysierenden Lösungen eingebracht, die übrigen 6 Öffnungen werden systemintern verwendet (Probenauftrag, Separationspuffer, Entfärbung/Verdünnung, Abfall, Proteinmarker). In jede der Öffnungen taucht eine Elektrode.

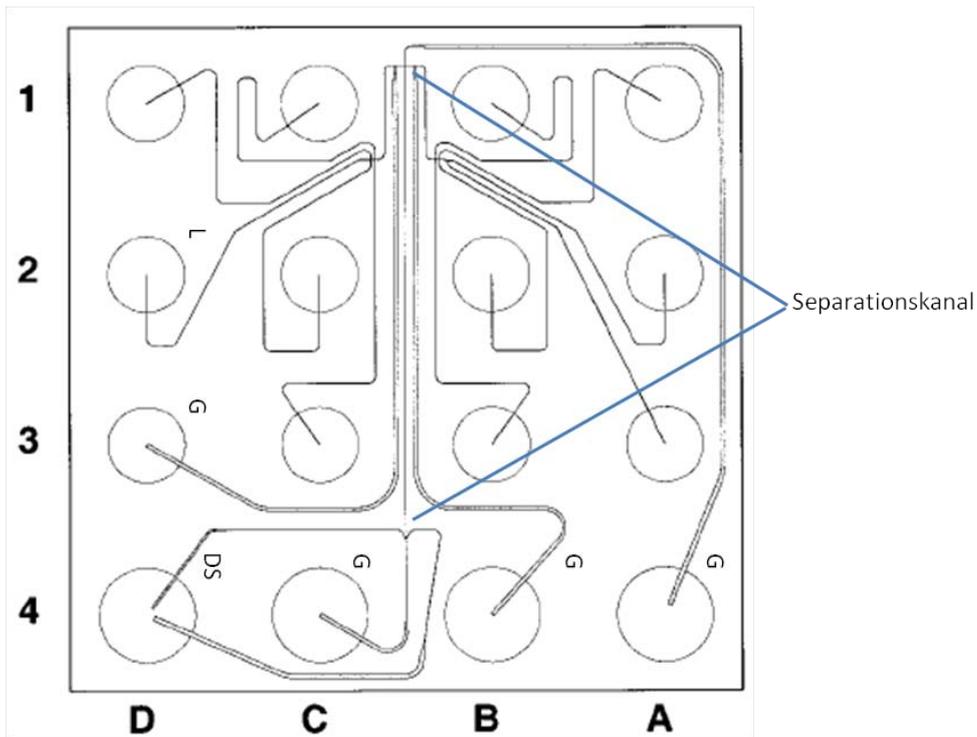


ABB. 1 CHIP DESIGN – FIGURE 1 NACH ANAL. CHEM. 2001, 73, 1207-1212 VGL. BILDNACHWEIS

Entsprechend dem Originaldesign¹⁹ sind alle Kanäle 13 μm tief und 36 μm breit und photolithographisch in Kalknatronglas geätzt. Unvernetztes Trenngel wird durch Anlegen von äußerem Druck in die Kanäle eingebracht. Auch bei dieser Methode werden während der Probenvorbereitung Proteine mit einem Überschuss an SDS vor dem Einbringen in den CGE Chip erhitzt, sodass denaturierte Proteine entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungszahlverhältnisses aufgetrennt werden.

Durch Anlegen einer Spannung an eine mit Probe gefüllte Öffnung wandert eine größere Menge Analytionen führende Probelösung am Separationskanal vorbei. Durch nachfolgendes Anlegen von Spannung an den Separationskanal wird eine nur mehr sehr kleine Menge – ca. 25 pL – aus der zuvor in das System „gezogenen“ Probe in den Separationskanal eingebracht („injiziert“), getrennt und zum Detektor geführt.

Die Proteindetektion erfolgt durch laserinduzierte Fluoreszenz über einen in den Protein-SDS-Komplexe eingelagerten Fluoreszenzfarbstoff. Da der Fluoreszenzfarbstoff auch in proteinlose SDS-Mizellen einlagert, wird zur Herabsetzung des störenden Hintergrundsignals 0,15 cm vor dem Detektor das Analysat unter die kritische Mizellarkonzentration von SDS verdünnt. Durch diesen Verdünnungsschritt steigt die Intensität des Messsignals – wie Bousse et al¹⁹ vermuten, binden jene Farbstoffmoleküle, die durch das zerfallen der SDS-Mizellen frei werden, zusätzlich an die Protein-SDS-Komplexe.

Um kleine Migrationszeitunterschiede auszugleichen, werden jeder Probe ein sogenannter Lower Marker (LM) von 4,5 kDa und ein Upper Marker (UM) von 230 kDa als interne Standards

zugesetzt. Die Migrationszeitdifferenz zwischen dem Passieren von unterem Marker (LM) und oberem Marker (UM) beim LIF Detektor beträgt 41 s.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wird außerdem ein externer Marker-Mix („Proteinladder“) mit Proteinen bekannter Molekülgröße vermessen.

2.1.2. MASSENSPEKTROMETRIE

2.1.2.1. GRUNDLAGEN

Massenspektrometrie ist eine Analysemethode, bei der Ionen im Vakuum nach ihrem Masse-zu-Ladungszahl-Verhältnis (m/z) getrennt werden.

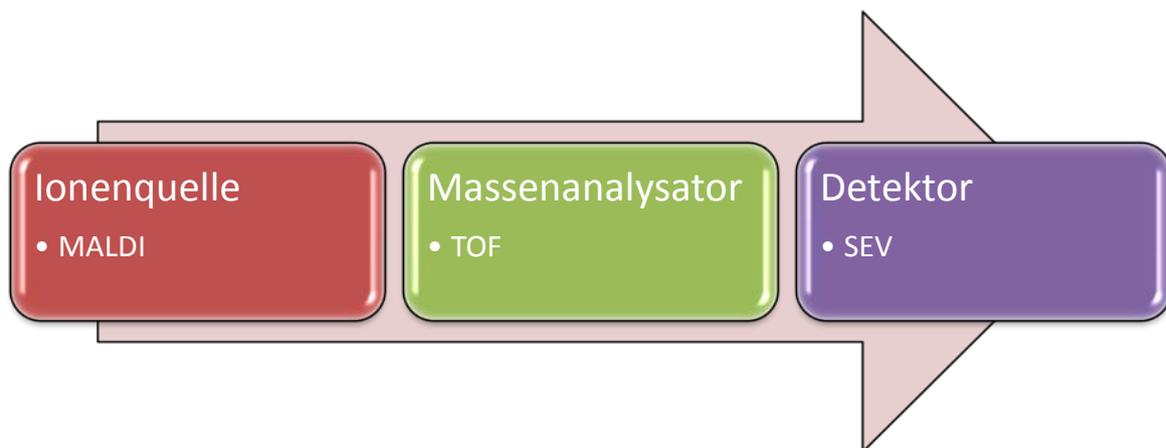


ABB. 2 SCHEMATISCHER AUFBAU EINES MASSENSPEKTROMETERS

Zunächst werden Analyten in der Ionenquelle aus der flüssigen Phase oder dem festen Zustand in den gasförmigen Zustand überführt, sofern sie nicht in Gasform vorliegen, und gleichzeitig ionisiert. Für biologische Makromoleküle wie z.B. Proteine eignen sich besonders die beiden sogenannten „soft ionization“ Verfahren Elektrosprayionisation (ESI) und Matrix-assisted Laserdesorption/Ionisation (MALDI).

Die Trennung der Analytionen erfolgt im Massenanalysator unter Hochvakuum. Für kleine Moleküle kann eine Auflösung bis weit unter einer Masseneinheit erreicht werden, für biologische Makromoleküle wie Proteine kann das Isotopenmuster der einfach geladenen Ionen bis ca. m/z 10000 aufgelöst werden, jedoch darüber ist eine Basislinien-Isotopenauflösung nicht mehr erreichbar. Durch Fragmentation im Ionenquellenteil bzw. direkt in manchen Analysatortypen oder Stoßkammern von Analytmolekülen kann auch Strukturinformation gewonnen werden. Am Detektor werden die Ionen detektiert und ihre Zahl ist proportional der gebildeten Ionen und der eingebrachten Substanzmenge.

2.1.2.2. MATRIX-ASSISTED LASERDESORPTION/IONISATION-FLUGZEIT- MASSENSPEKTROMETRIE (MALDI-TOF-MS)

MALDI ist eine der wenigen Desorptions/Ionisationsmethoden, mit denen intakte und thermolabile Proteine intakt in die Gasphase transferiert und ionisiert werden können. Unter der dafür notwendigen Matrix, in der die Makromoleküle eingebettet sind, versteht man kleine organische Moleküle, die eingestrahltes Laserlicht gut absorbieren können (z.B. Sinapinsäure). Für den Desorptions/Ionisationsprozess werden gelöst vorliegende Analytmoleküle mit einem großen molaren Überschuss an Matrixlösung versetzt und auf einen Probenträger, aus z.B. rostfreiem Stahl oder metallbeschichtetem Kunststoff, aufgetragen. Beim Trocknungsprozess verdampft das Lösungsmittel und die Analytmoleküle werden in das Kristallgitter der Matrix eingebaut. Die Energie eines eingestrahlten Laserpulses wird von den Matrixmolekülen absorbiert und dessen Energie durch intermolekulare Wechselwirkungen im Festkörper verteilt. Analytkonzentrationen betragen typischerweise 1-10 µmol/L und Matrixkonzentrationen 100 mmol/L, sodass das Verhältnis von Analyt- zu Matrixmolekülen 1:10⁴ bis 1:10⁵ beträgt. Explosionsartig gehen in diesem Bereich Matrix- wie auch die eingebetteten Proteinmoleküle in die Gasphase in extrem kurzer Zeit als intakte Einheiten über. Die selbst, zunächst ionisierten Matrixmoleküle ionisieren dann die Proteinmoleküle auf unterschiedlichsten Wegen, sodass (in Abwesenheit von Salzen) das intensivste Analytsignal meist ein protoniertes Molekül, nämlich [M+H]⁺, ist.

Die so generierten Ionen werden beschleunigt und treten dann in den massenspektrometrischen Analysator ein. Beim Flugzeit- (time-of-flight, TOF) Analysator wird die Flugzeit der Moleküle auf einer Strecke bekannter Länge gemessen. Die durch einen Laserpuls gleichzeitig gebildeten Ionen werden durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit Spannungen zw. 1 und 30 kV beschleunigt. Alle Ionen erhalten die gleiche kinetische Energie. Entsprechend der klassischen Mechanik werden dabei Moleküle unterschiedlicher Masse/Ladungszahl auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt. Nach dieser Beschleunigungsphase durchlaufen die Moleküle das feldfreie Flugrohr und treffen nach einer ihrem m/z-Verhältnis entsprechenden Flugzeit auf dem Detektor auf.

Die Kinetische Energie ist abhängig von der Beschleunigungsspannung U (z...Ladungszahl, e...Elementarladung, m...Masse des Ions, v...Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke).

$$E_{kin} = z * e * U = \frac{m * v^2}{2}$$

Die Geschwindigkeit eines Ions ist gegeben durch die bekannte Driftstrecke (Flugstrecke) s und die gemessene Flugzeit t , die das Ion zum Durchfliegen des Flugrohrs braucht.

$$v = \frac{s}{t}$$

Einsetzen in die Formel der kinetischen Energie und Umformen ergibt

$$\frac{m}{z} = \frac{2 * e * U * t^2}{s^2}$$

Bei bekannter Beschleunigungsspannung und Driftstrecke kann also allein durch Messung der Flugzeit auf das m/z -Verhältnis eines Ions geschlossen werden.

Zur Kalibration werden Referenzsubstanzen mit bekannten Molekülmassen vermessen. Bei einer Kalibration wird manchmal nicht nur das protonierte Molekül der Kalibrierstandards beobachtet, sondern auch Signale des doppelt geladenen, sprich zweifach protonierten, Ions $[M+2H]^{2+}$ oder des im Massenspektrometer generierten Dimers $[2M+H]^+$.

In MALDI-TOF Massenspektrometern werden meist zur Detektion Sekundärionenvervielfacher (SEV) mit vorgeschalteter Konversionsdynode verwendet. An der Dynodenkaskade ist ein, von Dynode zu Dynode steigendes Potential angelegt. Auf der Konversionsdynode auftreffende Anolytionen schlagen Elektronen aus einer Halbleiterschicht heraus, die auf die nächste Dynode auftreffend jeweils mehrere Sekundärelektronen generieren, wodurch der Elektronenstrom verstärkt wird. Dabei wird im Allgemeinen ein Verstärkungsfaktor von 10^6 erreicht.

3. EXPERIMENTELLES

3.1. GERÄTE

CGE-am-Chip: 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

Software: 2100 Expert

Version B.02.07.SI532

Planare-Gelelektrophorese:

klein: Mighty Small für 8x7x0,015 cm Gele, GE Healthcare (Freiburg, Deutschland);

groß: Vertical Slab 15W 16x18x0,015 cm, GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) (AGES)

Elektroelutionskammer: AGT-2-3, VWR (West Chester, PA, USA)

Blotter: TE 70 PWR, GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

Vakuumpfuge: Univapo 100, Montreal Biotechnologies Inc. (Dorval, Kanada)

Vakuumpfugenkühler: UNICRYO MC2L -60°C, Montreal Biotechnologies Inc. (Dorval, Kanada)

MALDI-TOF-MS: Axima-CFR^{plus} und Axima-TOF²,

Shimazu Biotech-Kratos Analytical (Manchester, Großbritannien)

Software: Shimazu Biotech Launchpad

Version 2.8.5

Probenträger (Target): FlexiMass-DS, Shimazu Biotech (Manchester, Großbritannien)

Wasseraufbereitung für ultrahochreines Wasser (UHQ): Simplicity Millipore system, ($\Omega_m \leq 18 \mu\text{S}/\text{cm}$) (Billerica, MA, USA)

Software Statistische Methoden:

DataLab

Version 2.650

MS Feature Extractor

Rel. 1.01

3.2. MATERIALIEN

Lithiumdodecylsulfat (LDS), Natriumdodecylsulfat (SDS), 2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol (DTT), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Acrylamid (AA) N,N'-Methylenbisacrylamid (BisAA), Coomassie-Brillant-Blau G-250 und R-250 (CBB), Glutaraldehyd, Natriumcarbonat (Na_2CO_3), Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3), Sinapinsäure, Glycin, Ammoniumpersulfat (APS), Tetramethylethyldiamin (TEMED), Bromphenolblau, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS), Thioharnstoff, α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA), Dimethylsulfoxid (DMSO), Ponceau S, Trifluoressigsäure (TFA), Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), Ethylenglycoldiacrylat, techn., 90 % (EDA), Ovotransferrin, Pyronin Y und die MALDI-TOF-MS-Kalibrierstandards Human Serum Albumin und Aldolase, ProteoMass 106K6108, wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Salzsäure (HCl), Essigsäure (HAc), Essigsäure, 100% (Eisessig), Ammoniumacetat, Natriumacetat (NaOAc), Trichloressigsäure (TCA), Ammoniak (NH_3), Silbernitrat (AgNO_3), Methanol (MeOH), Ethanol (EtOH), Acetonitril (ACN), Aceton, Formaldehyd, Glycerol, 2-Propanol wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Ameisensäure wurde von Acros Organics (Geel, Belgien), Harnstoff von Amresco (Solon, OH, USA) bezogen. SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard wurde von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), ZipTip-Pipettenspitzen C4 und C18 wurden von Millipore(Billerica, MA, USA) bezogen.

Elektroelutionsröhrchen (E-Röhrchen) Novagen D-Tube Dialyzer Maxi, Molecular Weight Cut Off 6-8, 2-3 mL wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen, Nitrozellulose (NZ) - Membran wurde bei Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) bezogen. Alle CGE-Chips und zugehörigen Chemikalien wurden als Agilent Technologies Kit (Waldbronn, Deutschland) bezogen.

3.3.LÖSUNGEN UND REZEPTUREN

3.3.1. PROBENVORBEREITUNG

EXTRAKTIONSLÖSUNG (WEIZEN, EINSTUFIG):⁸

11,6 % (v/v) Sammelgelpuffer (Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen (UPOV)) siehe 3.3.2.1

0,13 M SDS

185,5 M Pyronin Y

19 % (v/v) Glycerin

7,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

EXTRAKTIONSLÖSUNG (WEIZEN, ZWEISTUFIG):

1 % (w/v) SDS

1 % (w/v) DTT

EXTRAKTIONSLÖSUNG (WEIZEN, ZWEISTUFIG, MIT FARBSTOFF)

1 % (w/v) SDS

1 % (w/v) DTT

0,1 % (w/v) Pyronin Y

3.3.2. PLANARE GELELEKTROPHORESE

3.3.2.1. STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER

SAMMELGELPUFFER (UPOV) PH 6,8

1 M TRIS

HCl Zugabe bis zu einem pH-Wert von pH 6,8

SAMMELGELPUFFER (LÄMMLI UND Ethylenglycoldiacrylat (EDA)) PH 6,8

0,5 M TRIS

HCl Zugabe bis zu einem pH-Wert von pH 6,8

TRENNGELPUFFER (UPOV) PH 8,8

1M TRIS

HCl Zugabe bis zu einem pH-Wert von pH 8,8

TRENNGELPUFFER (LÄMMLI UND EDA) PH8,8

1,5 M TRIS

HCl Zugabe bis zu einem pH-Wert von pH 8,8

AA/BISAA-STAMMLÖSUNG (LÄMMLI UND EDA)

(30,8 % T; 2,6 % C Bis)

30% (w/v) AA

0,8% (w/v) BisAA

SDS-LÖSUNG, 10% (M/V)

0,35 M SDS

APS-LÖSUNG, 1% (M/V) (UPOV)

0,044 mM APS

APS-LÖSUNG, 10% (M/V) (LÄMMLI UND EDA)

0,44 mM APS)

ELEKTROPHORESEPUFFER (UPOV)

0,19 M Glycin

0,025 M TRIS

0,1 % (m/v) SDS

ELEKTROPHORESEPUFFER (LÄMMLI UND EDA)

12,5 mM TRIS

96 mM Glycin

1,75 mM SDS

DENATURIERUNGSPUFFER FÜR OVOTRANSFERRIN

25 % (v/v) Sammelgelpuffer (Lämmli und EDA) (→ 0,125 M TRIS, pH 6,8)

0,14 M SDS

20 % (v/v) Glycerol

2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

0,03 mM Bromphenolblau

3.3.2.2. GELELEKTROPHORESE – METHODE INTERNATIONALER
VERBAND ZUM SCHUTZ VON PFLANZENZÜCHTUNGEN (UPOV)⁸

	mL (Trenngel 7,2 %T; 1,8 %C)	mL (Trenngel 10,3 %T; 1,3 %C)
AA-Stammlösung, 40,02 %	7	10,5
BisAA-Stammlösung, 0,4%	13	13,7
Trenngelpuffer (UPOV) pH 8,8	15	15,8
UHQ	3	-
SDS-Lsg., 10 %	0,4	0,42
TEMED	0,02	0,02
APS, 1 %	1	1

TAB. 1 PLANARE GELELEKTROPHORESE TRENNGELE 7 %T UND 10,3 %T (METHODE UPOV) – ALLE PROZENTANGABEN (W/V)

	mL (Sammelgel 3 %T; 1,4 %C)
AA-Stammlösung, 40,02 %	1,5
BisAA-Stammlösung, 0,8 %	2,15
Sammelgelpuffer (UPOV) pH 6,8	2,5
UHQ	13,15
SDS-Lsg., 10 %	0,2
TEMED	0,015
APS, 1 %	0,75

TAB. 2 PLANARE GELELEKTROPHORESE SAMMELGEL (UPOV) – ALLE PROZENTANGABEN (W/V)

3.3.2.3. GELELEKTROPHORESE – METHODE LÄMMLI²⁰

	mL (Trenngel 10,2 %T; 2,6 %C)	mL (Sammelgel 4,1 %T; 2,6 %C)
AA/BisAA-Stammlösung	6,65	0,67
Trenngelpuffer (Lämmli und EDA) pH 8,8	5	-
Sammelgelpuffer (Lämmli und EDA) pH 6,8	-	1,25
UHQ	8,05	3
SDS-Lsg., 10 %	0,2	0,05
TEMED	0,0065	0,0025
APS, 10 %	0,1	0,025

TAB. 3 PLANARE GELELEKTROPHORESE (METHODE LÄMMLI) - ALLE PROZENTANGABEN (W/V)

3.3.2.4. GELELEKTROPHORESE
ETHYLENGLYCOLDIACRYLAT (EDA)²¹

METHODE

	mL, (Trenngel 11,6 %T; 2,6 %C)	mL (Sammelgel 4,1 %T; 2,6 %C)
AA-Stammlösung, 40 %	2,825	-
BisAA	15,7 mg	-
AA/BisAA-Stammlösung	-	0,335
EDA	0,016	-
Trenngelpuffer (Lämmli und EDA) pH 8,8	2,5	-
Sammelgelpuffer (Lämmli und EDA) pH 6,8	-	0,625
UHQ	4,5055	1,5
SDS-Lsg., 10 %	0,1	0,025
TEMED	0,0035	0,00125
APS, 10 %	0,05	0,0125

TAB. 4 PLANARE GELELEKTROPHORESE (METHODE EDA) - ALLE PROZENTANGABEN (W/V)

3.3.3. FÄRBEMETHODEN

3.3.3.1. GELFÄRBEMETHODEN - COOMASSIE-BRILLANT-BLAU (CBB)

CBB-FÄRBELÖSUNG (UPOV)⁸

0,0625 % (m/v) CBB G-250

0.01875 % (m/v) CBB R-250

6,5 % (v/v) Eisessig

18 % (v/v) MeOH oder EtOH

CBB-FÄRBELÖSUNG, OHNE SÄUREN UND ALKOHOL (UPOV)

0,0625 % (m/v) CBB G-250

0.01875 % (m/v) CBB R-250

CBB-FÄRBELÖSUNG

0.025 % (m/v) CBB R-250

7 % (v/v) Eisessig

40 % (v/v) MeOH

CBB-ENTFÄRBE LÖSUNG I

7 % (v/v) Eisessig

40 % (v/v) MeOH

CBB-ENTFÄRBE LÖSUNG II

7 % (v/v) Eisessig

5 % (v/v) MeOH

3.3.3.2. GELFÄRBE METHODEN-SILBERFÄRBUNG

SILBERFÄRBUNG- FIXIERLÖSUNG

30 % (v/v) EtOH

10 % (v/v) HAc

SILBERFÄRBUNG-SENSIBILISATOR

68 % (w/v) NaOAc

2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,5 % (v/v) Glutaraldehyd

30 % (v/v) EtOH

SILBERFÄRBUNG-SILBERLÖSUNG

0,25% (w/v) AgNO_3

0,04 % (v/v) Formaldehyd

SILBERFÄRBUNG-ENTWICKLERLÖSUNG

2,5 % (w/v) Na_2CO_3

0,02 % (v/v) Formaldehyd

SILBERFÄRBUNG-STOPPLÖSUNG

5 % (v/v) HAc

3.3.3.3. MEMBRANFÄRBE METHODEN

PONCEAU S FÄRBE LÖSUNG

0,1 % (w/v) Ponceau S

1 % (v/v) HAc

PONCEAU S ENTFÄRBELOESUNG

5 % (v/v) HAc

3.3.4. EXTRAKTIONSMETHODEN

GELBANDEN-ENTFÄRBELOESUNG (ZUR CBB-ENTFÄRBUNG)

40 % (v/v) ACN

60 % (v/v) NH_4HCO_3 , 50mM

3.3.4.1. EXTRAKTIONSMITTEL FÜR GELIMMOBILISIERTE PROTEINE

GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG A

33,33 % (v/v) Ameisensäure

66,66 % (v/v) 2-Propanol

GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG A1

33,33 % (v/v) Ameisensäure

66,66 % (v/v) 2-Propanol

1 % LDS

GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG B

7M Harnstoff

2M Thioharnstoff

4% CHAPS

GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG C

50 mM TRIS

200 mM Glycin

1 % LDS

→ mittels NH_3 auf pH8

GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG D

20 mM CHCA

1 % LDS

→ mittels NH_3 auf pH8

3.3.4.2. PROTEINTRANSFER-ELEKTROBLOTTEN

BLOTPUFFER:

25 mM TRIS

192 mM Glycin

20 % (v/v) MeOH

3.3.4.3. LÖSUNGSMITTEL / EXTRAKTIONSMITTEL FÜR MEMBRANIMMOBILISIERTE PROTEINE

MEMBRAN-LÖSUNGSMITTEL 1

DMSO

MEMBRAN-LÖSUNGSMITTEL 2

50 % (v/v) Aceton

50 % (v/v) 2-Propanol

MEMBRAN-EXTRAKTIONSLÖSUNG1

70 % (v/v) ACN

01 % (v/v) TFA

MEMBRAN-EXTRAKTIONSLÖSUNG 2

40 % (v/v) ACN

60 % (v/v) Ammoniumacetat 0,1M

3.3.5. KAPILLARGELELEKTROPHORESE-AM-CHIP

ZIPTIP-ANREICHERUNG FÜR EXTRAKTE VOR MESSUNG AM ASSAY PROTEIN 250

ACN + 0,1 % (v/v) TFA in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander

- 0% ACN

- 25% ACN
- 50% ACN
- 75% ACN
- 100%ACN

REHYDRIERPUFFER-NACH EINDAMPFEN DER EXTRAKTE IN VAKUUMZENTRIFUGE
VOR MESSUNG AM ASSAY PROTEIN 250

10 % (v/v) 10x Protein 250 Standard Labeling Puffer

0,7 M Harnstoff

0,2 M Thioharnstoff

0,4 % (w/v) CHAPS

3.3.6. MALDI-TOF-MS

3.3.6.1. MALDI-MATRIX

Sinapinsäure, 10 g / L, gelöst in ACN / 0,1 % (v/v) TFA 1:1

3.3.6.2. MALDI-TOF-MS-KALIBRIERSTANDARDS

HUMAN SERUM ALBUMIN

20 $\mu\text{mol} / \text{L}$

ALDOLASE

10 $\mu\text{mol} / \text{L}$

3.4. PROBENMATERIAL

Die Getreideexperimente wurden mit 15 verschiedenen Weichweizensorten (*Triticum aestivum* L.) durchgeführt, die alle für den Anbau in Österreich zugelassen sind.²²

Die untersuchten Sorten setzen sich aus Winter- und Sommerweizen unterschiedlicher Qualitätsstufen (Qualitätsweizen und Mahlweizen)²³ zusammen. Für alle untersuchten Sorten ist die Zusammensetzung der Gluteninuntereinheiten bekannt:²⁴

Name	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	Probe Nr.
Alora	0	7+9	5+10	33-34
Blasius	1	7+9	2+12	31-32
Capo	1	7+9	5+10	01-06
Element	1	7+9	5+10	23-28
	1	17+18	5+10	
Estevan	1	7+9	5+10	09-10
Fidelius	0	7+9	2+12	37-38
Indigo	2*	7+9	5+10	17-18
Kadrijl	1	14+15	5+10	11-12
Megas	0	6+8	2+12	15-16
Mulan	1	7+8	2+12	29-30
Papageno	0	6+8	2+12	21-22
Sensas	1	7+9	5+10	19-20
Stefanus	1	7+9	5+10	07-08
Vitus	1	17+18	5+10	13-14
Yello	2*	7+9	5+10	35-36
Extraktionslösung (Weizen, einstufig)				39

TAB. 5 DIE UNTERSUCHTEN WEIZENSORTEN MIT IHREN GLUTENINUNTEREINHEITEN. DIE SORTE ELEMENT KOMMT IN ZWEI GENVARIANTEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN ALLELEN AUF GLU-B1 VOR.

Die Weizenproben wurden vom Institut für Saatgut der AGES bezogen und stammen aus sortenreinen Versuchsfeldern.²⁵

3.5. PROBENVORBEREITUNG

3.5.1. EXTRAKTION

3.5.1.1. EINSTUFIGE EXTRAKTION⁸

Die Samenkörner einzeln mit einer Kombinationszange quetschen und in 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen mit 600 µL frisch bereiteter Extraktionslösung (Weizen, einstufig) suspendieren. Die Proben über Nacht bei Raumtemperatur extrahieren (mehrmals mittels Vortex-Gerät schütteln) und anschließend auf einem Thermomixer 10 min bei 99°C erhitzen. Die abgekühlten Proben anschließend 10 min bei 14799 Umdrehungen pro Minute / 16160 g zentrifugieren.

Wenn nicht anders angegeben, so wird für alle Messungen diese Methode verwendet.

3.5.1.2. ZWEISTUFIGE EXTRAKTION²⁶

Die Samenkörner (35-60 mg / Korn) einzeln mit einer Kombinationszange quetschten und in 2 mL Mikrozentrifugenröhrchen transferieren. Im ersten Extraktionsschritt mit 1-2 mL DMSO versetzen, 10 s am Vortex-Gerät schütteln und nach einer in definierten Extraktionszeit (siehe Tab. 6) bei 16000 g zentrifugieren. Den Überstand abziehen und als „Überstand A“ sammeln. Zum Pellet zwei Mal je 1 bzw. 2 mL Propan-1-ol zufügen, 10 s schütteln (Vortex-Gerät) und wieder nach gewisser Extraktionszeit (siehe Tab. 6) bei 16000 g zentrifugieren, um Gliadin, Albumin und Globulin zu entfernen. Die Überstände jeweils sammeln (nach erster Propanolanwendung als „Überstand B“ bei 20 min Extraktionszeit oder als „Überstand C“ bei 1 h Extraktionszeit, nach zweiter Propanolanwendung parallel dazu als „Überstand D“ oder „Überstand E“). Für den zweiten Extraktionsschritt 300 bzw. 600 µL Extraktionslösung (Weizen, zweistufig) zum Pellet zufügen und 30 min bei 65°C extrahieren (siehe Tab. 6). Abb. 3 zeigt eine Übersicht des Arbeitsablaufes.

Nr.	DMSO	Propanol	Extraktionsmittel
1	2 mL, über Nacht bei RT	2 mL, je ca. 20 min	600 µL, ohne Farbstoff
2	2 mL, über Nacht bei RT	2 mL, je ca. 20 min	600 µL, mit Farbstoff
3	2 mL, über Nacht bei RT	2 mL, je ca. 1 h	600 µL, mit Farbstoff
4	2 mL, über Nacht bei 4°C	2 mL, je ca. 20 min	600 µL, ohne Farbstoff
5	2 mL, über Nacht bei 4°C	2 mL, je ca. 20 min	600 µL, mit Farbstoff
6	2 mL, über Nacht bei 4°C	2 mL, je ca. 1 h	600 µL, mit Farbstoff
7	1 mL, über Nacht bei RT	1 mL, je ca. 20 min	300 µL, ohne Farbstoff
8	1 mL, über Nacht bei RT	1 mL, je ca. 20 min	300 µL, mit Farbstoff
9	1 mL, über Nacht bei RT	1 mL, je ca. 1 h	300 µL, mit Farbstoff

10	2 mL, 30 min bei RT	2 mL, je ca. 20 min	600 μ L, ohne Farbstoff
11	2 mL, 30 min bei RT	2 mL, je ca. 20 min	600 μ L, mit Farbstoff
12	2 mL, 30 min bei RT	2 mL, je ca. 1 h	600 μ L, mit Farbstoff

TAB. 6 VERSCHIEDENE EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN BEI DER ZWEISTUFIGEN EXTRAKTION

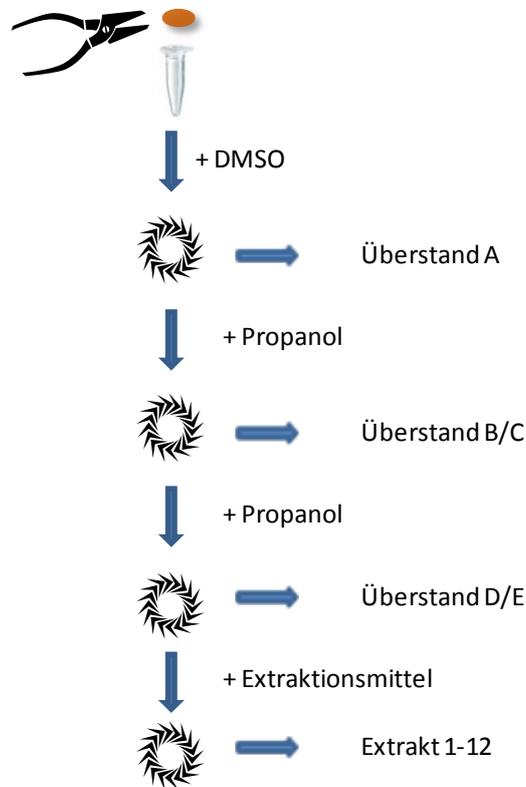


ABB. 3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZWEISTUFIGEN EXTRAKTION

3.5.2. LAGERUNG

Nach der Extraktion gemäß 3.5.1.1 Einstufige Extraktio⁸, werden die 38 Weizenproben und die Extraktionslösung (Weizen, einstufig) in Aliquote zu 15 μ L für spätere Messungen bei -20°C gelagert.

Für die Lagerstudien wird von jeder Probe je ein Aliquot zu 100 μ L bei 4°C und -20°C gelagert.

3.5.2.1. LAGERSTUDIE BEI 4°C

Eine Messung der Weizenproben und der reinen Extraktionslösung erfolgt nach einer Lagerzeit von 2, 4 und 8 Wochen.

Arbeitsablauf:

- Mikrozentrifugenröhrchen 5 s am Vortex-Gerät schütteln
- Mikrozentrifugenröhrchen 15 s in der Tischzentrifuge zentrifugieren

- 4 µL Probe entnehmen und gemäß 3.6.4.1 Methode A, vermessen

3.5.2.2. FRIER-AUFTAU-ZYKLEN“

Drei Frier-Auftauzyklen sollen vermessen werden, dazu immer nach folgendem Schema vorgehen:

- Die Weizenextrakte für mind. 30 min auftauen
- Am Vortex-Gerät gut schütteln
- Mittels Tischzentrifuge 15 s zentrifugieren. Je 4 µL Probe entnehmen und gemäß 3.6.4.1 Methode A, vermessen.
- Proben wieder bei -20°C einlagern

Um ein vollständiges Gefrieren der Probelösung zu gewährleisten, ist mindestens 48 h Lagerzeit zwischen den Messungen nötig.

3.5.3. PROTEINSTANDARD FÜR DIE PLANARE GELELEKTROPHORESE

Als Proteinstandard eine 1 %ige (w/v) Lösung von Ovotransferrin herstellen. Diese Lösung kann aliquotiert und bei -20°C gelagert werden. Unmittelbar vor der Elektrophorese die Proteinlösung mit dem gleichen Volumen an Denaturierungspuffer (3.3.2 Planare Gelelektrophorese) versetzen, 10 min auf 99°C erhitzen und nach dem Abkühlen in einer Tischzentrifuge abzentrifugieren.

3.6. GELELEKTROPHORESE

3.6.1. UPOV-STANDARDMETHODE MIT CBB-FÄRBUNG

3.6.1.1. GELHERSTELLUNG

Die Gelgießapparatur (groß, 16×18×1,5 cm) vorbereiten, dabei die unteren Kontaktstellen zwischen Glasplatten und Abstandhaltern durch Beschichten mit Laborfett zusätzlich abdichten. Für zwei Gele die Rezeptur gemäß Tab. 1 (3.3.2 Planare Gelelektrophorese) befolgen, hierbei zuerst in einem Becherglas AA-Stammlösung, BisAA-Stammlösung, Trenngelpuffer und gegebenenfalls UHQ vereinigen. Die Mischung in einer Büchner-Flasche 3 min lang entgasen. Zuletzt APS-Lösung, SDS-Lösung und TEMED zufügen und rasch, unter Vermeidung von Luftblasenbildung die Gele gießen – nach oben hin muss noch mindestens 3-4 cm Platz für das Sammelgel verbleiben. Das Trenngel mit 1-2 ml wassergesättigtem n-Butanol überschichten und mindestens 20 min polymerisieren lassen.

Nach erfolgter Polymerisation das n-Butanol durch Spülen mit deionisiertem Wasser entfernen und den Gelrand mit Filterpapier trocknen. Zur Bereitung des Sammelgels wieder gemäß Rezeptur Tab. 2 (3.3.2 Planare Gelelektrophorese) (Angaben für 2 Gele) zuerst AA-Stammlösung, BisAA-Stammlösung, Sammelgelpuffer und UHQ in einem Becherglas vereinigen, die Mischung in einer Büchner-Flasche 3 min lang entgasen und zuletzt SDS-Lösung, APS-Lösung und TEMED zufügen. Mit dieser Mischung sogleich das Sammelgel überschichten und die Probenkämme unter Vermeidung von Lufteinschlüssen einsetzen. Nach einer Polymerisationszeit von mind. 20 min die Gele durch befeuchteten Zellstoff und in der Größe genau passende Polyethylenbeutel vor dem Austrocknen schützen und im Kühlschrank vollständig auspolymerisieren lassen.

3.6.1.2. DIE ELEKTROPHORESE

Am Vortag bereitete Gele in die Elektrophoresekammer einsetzen und die Probenkämme entfernen. Auf 15°C temperierten Elektrophoresepuffer einfüllen und dabei die Geltaschen spülen. Die Proteinextrakte in die Geltaschen einbringen (Auftragsvolumen 10 µL / Tasche). Die Elektrophorese bei konstantem Strom betreiben; Anfangs (bei 2 Gelen pro Kammer) 80 mA Stromzufuhr, sobald der Pyronin-Marker durch das Sammelgel gewandert ist, den Strom auf 160 mA erhöhen. Die Elektrophorese ist beendet, wenn der Pyronin-Marker das untere Ende des Trenngels erreicht hat.

3.6.1.3. FIXIEREN UND FÄRBEN

Die Gele aus der Elektrophoresekammer nehmen, öffnen und das Sammelgel abtrennen. In 15% (v/v) TCA mindestens 30 min fixieren. Mit UHQ spülen und über Nacht in CBB-Färbelösung (UPOV) (3.3.3 Färbemethoden) färben. Zwecks Entfärbens 2 h lang unter mehrmaligem Wasserwechsel mit UHQ waschen. Die Gele auf einem Flachbrett-PC-Scanner einscannen.

3.6.1.4. FÄRBEN OHNE FIXIEREN

Statt des Fixierschrittes 10 min mit UHQ spülen. Zum Färben bei einem der Gele CBB-Färbelösung (UPOV) (3.3.3 Färbemethoden) einsetzen beim zweiten Gel CBB-Färbelösung, ohne Säuren und Alkohol (UPOV), verwenden. Parallel zur oben beschriebenen Methode über Nacht färben, und anschließend 2 h unter mehrmaligem Wasserwechsel mit UHQ entfärben. Die Gele auf einem Flachbrett-PC-Scanner einscannen.

3.6.2. PLANARE GELELEKTROPHORESE (LÄMMLI UND EDA)

3.6.2.1. SODIUMDODECYLSULFAT - POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) METHODE LÄMMLI

GELHERSTELLUNG

Die Gelgießapparatur (7×8×0,015 cm) vorbereiten, ein zusätzliches Abdichten mit Laborfett ist nicht nötig, jedoch eine Kontrolle der Dichtheit mit deionisiertem Wasser zweckmäßig. Zur Bereitung von 2 Sammelgelen gemäß Tab. 3, (3.3.2 Planare Gelelektrophorese (Methode Lämml)) zunächst AA/BisAA-Stammlösung, Trenngelpuffer, SDS-Lösung und Wasser in einem Becherglas vereinigen und 5 min mittels Ultraschallbad entgasen. Hernach APS-Lösung und TEMED zufügen, nochmal 1 min entgasen und sofort die Gelgießapparatur etwa 6 cm hoch befüllen. Mit 100 µL wassergesättigtem 1-Butanol überschichten und mind. 30 min polymerisieren lassen. Danach das Butanol durch mehrmaliges Spülen mit deionisiertem Wasser entfernen.

Für das Sammelgel wieder zuerst AA/BisAA-Stammlösung, Sammelgelpuffer, SDS-Lösung und Wasser in einem Becherglas vereinigen, 5 min entgasen und danach APS-Lösung und TEMED zufügen. 1 min entgasen, die Apparatur bis zu Rand mit Sammelgel füllen und die Probenkämme einsetzen.

DIE ELEKTROPHORESE

Nach weiteren 30 min Polymerisationszeit die Gele in die Elektrophoresekammer einsetzen und die Probenkämme entfernen. Eine Fließwasserkühlung der Elektrophoresekammer ist möglich, jedoch nicht unbedingt nötig. Den Elektrophoresepuffer derart einfüllen, dass dabei die Geltaschen gründlich gespült werde. Die Proteinextrakte bzw. Standardproteine (Proteinkonzentration 1g/L) in die Geltaschen einbringen (Auftragvolumen 10 µL / Tasche). Auch eine vorgefärbte Standardmischung (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard) kann aufgetragen werden, jedoch nur 1-2 µL / Tasche.

Die Elektrophorese bei konstantem Strom von 50 mA betreiben (2 Gele pro Kammer) und die Spannung auf maximal 220 V begrenzen. Die Elektrophorese ist beendet, wenn der Bromphenol- oder Pyronin-Marker bis zur Füllhöhe des Puffers in der unteren Pufferkammer gewandert ist.

FÄRBEN UND ENTFÄRBEN

Die Gele aus der Elektrophoresekammer nehmen, öffnen und das Sammelgel abtrennen. Ohne vorherigem Fixieren die Gele mit UHQ spülen 30 min mit CBB-Färbelösung (3.3.3 Färbemethoden) färben. Zum Entfärben nach kurzer Spülung mit UHQ zunächst für 30 min in CBB-Entfärbelösung I (3.3.3 Färbemethoden) belassen und hernach über Nacht in CBB-Entfärbelösung II (3.3.3 Färbemethoden) schwenken. Die Gele auf einem Flachbrett-PC-Scanner einscannen.

3.6.2.2. SDS-PAGE METHODE EDA²¹

Für die Gelherstellung parallel zu SDS-PAGE Methode Lämmli (3.6.2.1) vorgehen, jedoch Angaben für Planare Gelelektrophorese (Methode EDA) Tab. 4 (3.3.2 Planare Gelelektrophorese) befolgen.

Die Elektrophoresebedingungen werden wie in SDS-PAGE Methode Lämmli (3.6.2.1) gewählt – mit einer Laufzeiterhöhung um einige Minuten muss gerechnet werden. Auch das Färben und Entfärben erfolgt wie in Methode Lämmli (3.6.2.1).

3.6.2.3. SILBERFÄRBUNG²⁷

Die Silberfärbung kann direkt nach der Gelelektrophorese, oder im Anschluss an eine CBB-Färbung erfolgen.

Zunächst das Gel 30 min in der Silberfärbung-Fixierlösung (3.3.3 Färbemethoden) belassen – dieser Schritt kann im Falle einer vorhergehenden CBB-Färbung übersprungen werden.

Anschließend 3 mal 5 min in UHQ waschen und für 30 min mit Silberfärbung-Sensibilisator (3.3.3 Färbemethoden) versetzen. Wieder mit UHQ waschen, diesmal jedoch 3 mal 10 min, für 20 min in der Silberfärbung-Silberlösung (3.3.3 Färbemethoden) belassen und danach 2 mal 1 min mit UHQ waschen. Silberfärbung-Entwicklerlösung (3.3.3 Färbemethoden) portionsweise zufügen, bis die Färbung die gewünschte Intensität aufweist. Durch Waschen mit Silberfärbung-Stopplösung (3.3.3 Färbemethoden) die Entwicklung stoppen – nach kurzer Inkubationszeit in Stopplösung kann das Gel in Wasser aufbewahrt werden.

3.6.3. EXTRAKTION AUFGETRENNTER PROTEINE

Das intakte, CBB-gefärbte Gel auf eine Glasplatte transferieren, für schwach gefärbte Banden auf einem Leuchtschirm arbeiten. Die gewünschten Banden so knapp wie möglich mit einem Skalpell ausschneiden und in jeweils ein Mikrozentrifugenröhrchen transferieren. Das Gel immer wieder mit UHQ befeuchten, da es sonst leicht einreißt. Kurz die Gelstücke zentrifugieren.

3.6.3.1. EXTRAKTION AUS GELSTÜCKEN (SCHÜTTELN)

GELE NACH METHODE UPOV UND LÄMMLI HERGESTELLT:

ENTFÄRBN

Jede Gelbande mit einer minimalen Menge an Gelbanden-Entfärbelösung (3.3.4 Extraktionsmethoden) (ca. 20 µL) versetzen und am Vortex-Gerät schütteln. Nach 10-30 min Entfärbelösung abziehen und gegebenenfalls den Schritt wiederholen. Nach der vollständigen Entfärbung der Bande mit 20 µL UHQ waschen und nach abziehen der Waschlösung die Bande an der Gefäßwand zerreiben. Die Mikrozentrifugenröhrchen kurz zentrifugieren.

EXTRAHIEREN

Die Mikrozentrifugenröhrchen mit einer kleinen Menge (20-50 µL) Gelbandenextraktionslösung A, A1, B, C oder D versetzen und am Vortex-Gerät schütteln, ev. 10 min mit Ultraschall behandeln. Die Extraktion kann gekühlt (4°C) oder unter erhöhter Temperatur (37°C) erfolgen und sich über 1-3 Tage erstrecken (1 Tag bei 4°C und 3 h bei 37°C extrahiert: Abb. 30 ,drei Tage extrahiert bei 4°C: Abb. 31, Abb. 32, Abb. 34 und Abb. 35, alle Kapitel 4.5.3.1)

.Jedenfalls durch schütteln (kontinuierlich oder manuell am Vortex-Gerät) für Durchmischung sorgen.

GELE NACH METHODE EDA HERGESTELLT

ENTFÄRZEN UND HYDROLYTISCHE SPALTUNG VON EDA

Jede Bande mit 200 µL Gelbanden-Entfärbelösung (3.3.4) versetzen und 30 min inkubieren. 100 µL der Entfärbelösung verwerfen und zur verbleibenden Lösung 250 µL ACN zusetzen. Sobald die Banden milchig geworden sind, die Flüssigkeiten entfernen und für 2 Stunden in je 100 µL 5M NH₃ inkubieren. 3 Mal je 30 min in 25mM NH₄CO₃ waschen (150, 50 und 25 µL) und abschließend kurz in UHQ waschen.

EXTRAHIEREN

Die Mikrozentrifugenröhrchen mit einer kleinen Menge (20-50 µL) Gelbandenextraktionslösung C oder D versetzen und am Vortex-Gerät schütteln, ev. 10 min mit Ultraschall behandeln. Zwei Tage bei 4°C unter ständigem Schütteln extrahieren.

3.6.3.2. ELEKTROELUTION

GELE NACH METHODE UPOV UND LÄMMLI HERGESTELLT:

Die Elektroelution gemäß dem Novagen User Protocol TB422 Rev. F 0508 durchführen.²⁸

Die Membranen der E-Röhrchen mind. 5 min mit UHQ equilibrieren – dabei die Dichtheit prüfen. Ausgeschnittene, gefärbte Gelbande in die E-Röhrchen transferieren und diese vollständig mit Elektrophoresepuffer (UPOV) (3.3.2 Planare Gelelektrophorese) füllen. E-Röhrchendeckel unter Vermeidung von Luftblasen im Röhrchen aufsetzen und E-Röhrchen derart in die Röhrchenhalterung einsetzen, dass die Membranfenster normal zu den Feldlinien während der späteren Elution stehen. Die Elutionskammer mit dem gleichen Elektrophoresepuffer (UPOV) füllen.

Elutionsbedingungen: 100 V konstante Spannung, bei höchstens 250 mA, 4 h. Um Proteine von der Membran zu lösen nach dem Ende der Elutionszeit noch 1 min bei umgekehrter Stromrichtung eluieren, und nach dem Öffnen der E-Röhrchen das Eluat 5 mal über die Innenseite der Membran pipettieren. Eluat in Mikrozentrifugenröhrchen transferieren.

Für die Analyse ein Aliquot entnehmen (z.B. 4 µL für CGE-am-Chip). Wegen der hohen benötigten Puffermengen im Inneren des E-Röhrchen (2 mL) Eluats in der Vakuumzentrifuge auf mind. die Hälfte des Volumens einengen und auch davon ein Aliquot vermessen.

GELE NACH METHODE EDA HERGESTELLT

Vor dem Einbringen der Gelstücke in die E-Röhrchen wird EDA hydrolytisch gespalten (ohne vorheriger Entfärbung): Gelbanden in Mikrozentrifugenröhrchen für 2 Stunden in je 100 µL 5M NH₃ inkubieren. 3 Mal je 30 min in 25mM NH₄CO₃ waschen (150, 50 und 25 µL) und abschließend kurz in UHQ waschen. Die derart behandelten Gelbanden in equilibrierte E-Röhrchen überführen und Elektroelution genau wie oben für Gele nach UPOV- und Lämmli Methode beschrieben durchführen.

3.6.3.3. BLOTTEN, EXTRAKTION AUS BLOTMEMBRAN

GELE NACH METHODE UPOV UND LÄMMLI HERGESTELLT:

SDS-PAGE-Gele können vor oder nach einer CBB-Färbung bzw. nach CBB-Entfärbung geblottet werden. Das zu blottende Gel oder Gelstück in Blotpuffer (3.3.4 Extraktionsmethoden) equilibrieren. Eine NZ-Membran etwas größer als das Gelstück, sowie mind. 6 Filterpapierstücke gleich groß wie das Gel zuschneiden. Sollen nur einzelne, zuvor ausgeschnittene Gelbanden geblottet werden, ist zusätzlich eine Maske aus nichtleitendem Material nötig, die Aussparungen in der Größe der zu blottenden Banden aufweist.

Die Elektroden mit deionisiertem Wasser befeuchten und 3 Lagen, in Blotpuffer getränktes Filterpapier luftblasenfrei auf die Kathode auflegen. Die, in Blotpuffer getränkte, Membran aufbringen, wenn nötig darauf die Maske platzieren und darauf das zu blottende Gel/Gelstück legen. Zuletzt mind. 3 Lagen puffergetränktes Filterpapier derart aufbringen, dass es nicht zum Kurzschluss zu den untersten Filterpapieren kommen kann.

Blotbedingungen: 1 h bei 0,8 mA / cm²

Wurde ein ungefärbtes Gel geblottet, so ist eine Färbung mit Ponceau S anzuschließen. Die Membran kurz mit UHQ spülen und für 5 min in ein Bad von Ponceau S-Färbelösung (3.3.3 Färbemethoden) legen. Nach erneutem Abspülen mit Wasser die Membran solange, jedoch höchstens 5 min, in der Ponceau S-Entfärbelösung (3.3.3 Färbemethoden) belassen, bis der Hintergrund nahezu entfärbt ist. Die Ponceau S-Banden sind eventuell nur im Gegenlicht erkennbar. Wurde ein CBB-gefärbtes Gel geblottet, so sind die Proteinbanden auf der Membran an ihrer blauen Färbung erkennbar.

CBB- oder Ponceau S – gefärbte Banden mittels Skalpell auf einer Glasplatte, platziert auf einem Leuchtschirm ausschneiden und in Mikrozentrifugenröhrchen transferieren. Kurz auf einer Tischzentrifuge zentrifugieren.

Die minimale Menge zur vollständigen Benetzung, für längere Extraktionen jedoch bis zu 50 µL, an Membran-Extraktionslösung 1 oder 2, Gelbanden-Extraktionslösung A oder A1 oder Membran-Lösungsmittel 1 oder 2 zusetzen. Am Vortex-Gerät gut schütteln und ev. 10 min mit

Ultraschall behandeln. Die Extraktion gekühlt (4°C) oder unter erhöhter Temperatur (37-42°C) 1-3 Tage durchführen, (1 Tag bei 42°C extrahiert: Abb. 37, ein Tag bei 37°C, anschließend zwei Tage bei 4°C: Abb. 49). Das Lösen der Membran bei RT innerhalb eines Tages durchführen. Jedenfalls durch Schütteln (kontinuierlich oder manuell am Vortex-Gerät) für Durchmischung sorgen.

GELE NACH METHODE EDA HERGESTELLT

Vor der Elektroelution wird der Quervernetzer EDA hydrolytisch gespalten werden. Das zu blottende Gelstück zwei Stunden lang mit 5M NH₃ inkubiert und anschließend 2 mal mit 25mM NH₄CO₃ waschen. Nach einem weiteren Waschschrift mit UHQ, Elektroblott und Extraktion aus der Blotmembran genau wie oben für Gele nach UPOV- und Lämmli Methode beschrieben durchführen.

3.6.4. KAPILLARGELELEKTROPHORESE-AM-CHIP

Die Probenpufferinhaltsstoffe müssen für die CGE-am-Chip gewissen Vorgaben genügen, so dürfen z.B. die Salz- und Detergenzienkonzentration sowie der Anteil an organischen Lösungsmitteln nicht zu hoch sein. Details hierzu können den Agilent Protein Chip Guides entnommen werden.^{29, 30}

Sind in der Proteinprobe organische Lösungsmittel vorhanden, so wird dieses mittels der Ultrazentrifuge verdampft. Eine minimale Menge (4,1 µL) eines kompatiblen Puffers wird zugegeben (z.B. Gelbandenextraktionspuffer oder UHQ, wenn die Probe zuvor schon in einem Puffer vorgelegen ist). Sollte sich durch Aufkonzentration ein zu hoher Salz- oder Detergenziengehalt ergeben, so wird mehr als die minimale Menge an UHQ zugefügt. Mittels Ultraschallbehandlung wird die Ablösung der Proteine von der Gefäßwand unterstützt gefolgt vom Schütteln am Vortex-Gerät.

3.6.4.1. METHODE A

Der Agilent Protein 230 Assay ist zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen zwischen 14 und 230 kDa geeignet. 10 Proteinproben können auf einem Chip gemessen werden, die Detektion erfolgt durch nichtkovalente Fluoreszenzfarbstoffeinlagerung in die SDS-Proteinemizelle. Die Chippräparation erfolgt exakt gemäß dem Agilent Protein 230 Kit Quick Start Guide³¹. Eine genaue Liste der kompatiblen Puffer und Pufferbestandteile kann dem Agilent Protein 230 Kit Guide Edition²⁹ entnommen werden wie schon oben angeführt.

DIE PROBENVORBEREITUNGSSCHRITTE FÜR EINEN CHIP:

- In einem Mikrozentrifugenröhrchen je 4 μL einer Proteinprobe mit 2 μL Denaturierungslösung mischen
- In ein Mikrozentrifugenröhrchen 6 μL -Aliquot der Proteinmarkers („Ladder“) vorlegen
- Alle Mikrozentrifugenröhrchen für 5 min auf 95-100°C erhitzen
- Abkühlen lassen und für 15 s zentrifugieren
- Zu Proben und Marker je 84 μL UHQ fügen und am Vortex-Gerät mischen
- 12 μL Gel-Farbstoffmischung in entsprechend markierte (linke obere) Öffnung des Chip pipettieren
- Mittels Befüllungsapparatur durch Anlegen von Druck für 1 min Gel-Farbstoffmischung im Chip verteilen
- Die verbleibende Gel-Farbstoffmischung aus Öffnung entfernen
- 12 μL Gel-Farbstoffmischung in alle 4 mit G markierten Öffnung pipettieren
- 12 μL Entfärbelösung in die mit DS markierte Öffnung pipettieren
- Jeweils 6 μL Probe in die 10 dafür vorgesehenen Öffnung pipettieren
- 6 μL Marker in die mit einem Leitersymbol markierte Öffnung pipettieren
- Den derart gefüllten Chip unmittelbar danach in Bioanalyser einlegen und Messung starten

3.6.4.2. METHODE B

Der Agilent Protein 250 High Sensitivity Assay ist zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen zwischen 10 und 250 kDa geeignet in einem Konzentrationsbereich von 1 mg bis 3 g / L Totalproteingehalt. Die Detektion erfolgt durch kovalente Fluoreszenzmarkierung der Proteine vor Bildung des SDS-Protein-Mizellen und anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung.

Die Labelingreaktion ist anfällig gegen Störungen durch in der Probe vorhandenen Pufferinhaltsstoffen (Detergenzien, S-S-Bindungsspalter, primäre Amine, Thiolgruppen, usw.). Die genaue Liste kann dem Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide³⁰ entnommen werden. Sollten Störsubstanzen in der Probe die Derivatisierung und/oder Messung unmöglich machen, so kann vor der Labelingreaktion eine Umkehr-Festphasenextraktion mittels ZipTip-Technologie, wie in 3.7.1 beschrieben, erfolgen. Die organischen Lösungsmittel, die zur Elution der Proteine von der Umkehr-Festphase notwendig waren, werden in der Vakuumzentrifuge entfernt und die Probe wird mit 5 μL Rehydrierpuffer (3.3.5 Kapillargelelektrophorese-am-Chip) versetzt und 4 min mit Ultraschall behandelt.

Die Fluoreszenzmarkierung und Chippräparation erfolgt exakt gemäß dem Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide.³⁰

DIE PROBENVORBEREITUNGSSCHRITTE FÜR EINEN CHIP:

- Je 5 μL der Proteinproben und des Proteinmarkers in Mikrozentrifugenröhrchen vorlegen
- Röhrchen Eisbad stellen
- Je 0,5 μL Färbelösung zufügen, am Vortex-Gerät mischen und 5 s zentrifugieren
- 30 min am Eisbad inkubieren
- Je 0,5 μL Ethanolamin zufügen, am Vortex-Gerät mischen und 5 s zentrifugieren
- 10 min am Eisbad inkubieren
- Proteinproben und Proteinmarker 1:200 mit UHQ verdünnen
- Je 4 μL der Proben und des Markers in einem Mikrozentrifugenröhrchen mit 2 μL Denaturierungslösung mischen
- Alle Mikrozentrifugenröhrchen für 5 min auf 95-100°C erhitzen
- Abkühlen lassen und für 15 s zentrifugieren
- 12 μL Gel-Farbstoffmischung in entsprechend markierte (linke obere) Öffnung des Chip pipettieren
- Mittels Befüllungsapparatur durch Anlegen von Druck für 1 min Gel-Farbstoffmischung im Chip verteilen
- Die verbleibende Gel-Farbstoffmischung aus Öffnungentfernen
- 12 μL Gel-Farbstoffmischung in alle 4 mit G markierten Öffnungpipettieren
- 12 μL Entfärbelösung in die mit DS markierte Öffnung pipettieren
- Jeweils 6 μL Probe in die 10 dafür vorgesehenen Öffnung pipettieren
- 6 μL Marker in die mit einem Leitersymbol markierte Öffnung pipettieren
- Den derart gefüllten Chip unmittelbar danach in Bioanalyser einlegen und Messung starten
-

3.6.4.3. REPRODUZIERBARKEIT DER WEIZENGLUTENINMESSUNG MITTELS METHODE A

Die Intra- und Interchipreproduzierbarkeit der CGE-am-Chip Methode A wurde untersucht. Dazu werden drei ausgewählte Einzelkornextrakte drei bis vier Mal auf zwei Chips vermessen. Zur Berechnung der Interchipreproduzierbarkeit werden auch Messergebnisse von anderen Tagen mit einbezogen.

Die Auswertung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeit und der Messsignalintensität erfolgt durch Ermittlung des Variabilitätskoeffizienten (%CV) repräsentativer Signale im Bereich der HMW-GUE und der Gliadine.

3.7.MASSENSPEKTROMETRIE

3.7.1. PROBENVORBEREITUNG: UMKEHR-FESTPHASENEXTRAKTION MITTELS ZIPTIP TECHNOLOGIE

Die Proben/Matrixkristallisation und Desorption/Ionisation der Analyten bei der MALDI-MS Technik wird durch Probeninhaltsstoffe wie beispielsweise Detergenzien maßgeblich gestört, so dass ein Aufreinigungsschritt nötig ist. Ziptip-Pipettenspitzen sind mit einer Polymer-Silika-Bett-Porengröße von 20 nm (C4) oder 30 nm (C18) erhältlich. Die geeigneten Ziptip-Pipettenspitzen sowie die idealen Proteinelutionsbedingungen müssen für jedes Zielprotein einzeln ermittelt werden.

Optimierung der Aufreinigung am Beispiel von Ovotransferrin:

Ovotransferrin wird in einer Konzentration von 0,1 g / L vorgelegt, wobei das Lösungsmittel 0,1 % (v/v) TFA enthält.

Für jede der beiden möglichen Ziptip-Pipettenspitzen nach folgendem Schema vorgehen – dabei mit einer 10µL Kolbenhubpipette bei maximalem Hub arbeiten, wobei der Flüssigkeitsspiegel einer einmal benetzten Pipettenspitze niemals unter die obere Polymer-Silika-Bett-Kante sinken darf.

- Spitze durch einmaliges Befeuchten mit ACN equilibrieren
- Spitze mit 0,1 % TFA 5 mal waschen
- Probe 5 mal langsam durch Spitze saugen
- Spitze 5 mal mit 0,1 % TFA waschen → vereinigte Waschlösungen sammeln
- Spitze 5 mal mit ACN / 0,1 % TFA 1:3 waschen → vereinigte Waschlösungen sammeln
- Spitze 5 mal mit ACN / 0,1 % TFA 1:1 waschen → vereinigte Waschlösungen sammeln
- Spitze 5 mal mit ACN / 0,1 % TFA 3:1 waschen → vereinigte Waschlösungen sammeln
- Spitze 5 mal mit ACN waschen → vereinigte Waschlösungen sammeln

Die fünf Waschlösungen verschiedener ACN / 0,1 % TFA – Zusammensetzung pro Spitzentyp zwecks Aufkonzentration in der Vakuumzentrifuge zur Trockene bringen und anschließend mit je 10 µL ACN : 0,1 % TFA 1:1 (v:v) versetzen. Proben 2 min ultraschallbehandeln, am Vortex-Gerät schütteln und wie in den Folgeunterkapiteln beschrieben am MALDI-TOF-MS vermessen, um die optimale Elutionslösung zu eruieren.

Vorgehensweise der Probenaufreinigung, nachdem die optimale Elutionslösung (im Falle von Ovotransferrin: ACN / 0,1 % TFA 1:1v:v) ermittelt wurde:

- Spitze mit Elutionslösung equilibrieren
- Spitze mit 0,1 % TFA 5 mal waschen
- Probe 5 mal langsam durch Spitze saugen

- Spitze 5 mal mit 0,1 % TFA waschen → Waschlösung verwerfen
- Spitze 5 mal mit Elutionslösung spülen → vereinigte Elutionslösungen sammeln

Für die Weizengluteninuntereinheiten kann diese Optimierung nicht durchgeführt werden, da die Proteine nicht isoliert vorliegen. Nach dem Elutionsschritt mit der vermutlich idealen Elutionslösung deshalb noch einen zusätzlichen Elutionsschritt ausführen:

- Spitze 5 mal mit ACN waschen → vereinigte Waschlösungen sammeln

3.7.2. PROBENPRÄPARATION MALDI-TOF-MS

Einweg – Kunststoff/Metall-Fleximass-Targets werden für die Präparation und anschließende Messungen ausgewählt.

Als MALDI-Matrix wird für Proteine dieser Größe (> 15 kDa) bevorzugt Sinapinsäure (3.3.6 MALDI-TOF-MS) eingesetzt und die Präparation der Targets erfolgt in der Dried-Droplet-Technique.³² Zwei unterschiedliche Vorgehensweisen werden dabei angewendet:

- Die gleiche Menge an Matrix und Probe in einem Mikrozentrifugenröhrchen mischen, davon 1-2 µL auf das Target auftragen und an der Luft trocknen lassen. – Für DMSO-haltige Proben jedoch ein Volumen-Verhältnis Probe : Matrix = 1 : 3 wählen.
- 1µL Matrixlösung auf Target auftragen, schnell 1 µL Probe in den gleichen Tropfen pipettieren, zwecks Mischen Tropfen mit der Kolbenhubpipette mehrmals aufsaugen.

Zur Erstellung der Kalibrationsspotts wird jeweils in gleicher Weise vorgegangen.

3.7.3. KALIBRATION

Kalibration erfolgt wahlweise mit:

- Human Serum Albumin (3.3.6 MALDI-TOF-MS), verdünnen auf 2 bzw. 4 µmol / L – jeweils 1 µL Kalibrierlösung zu 1µL Matrix auftragen.
Masse: 66478 Da durchschnittliche molare Masse
Ionen zur Kalibration: $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ und $[2M+H]^+$
- Aldolase (3.3.6 MALDI-TOF-MS), unverdünnte Kalibrierlösung, jeweils 0,5 µL Kalibrierlösung zu 1 µL Matrix auftragen.
Masse: 39211 Da durchschnittliche molare Masse
Ionen zur Kalibration: $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ und $[2M+H]^+$

3.7.4. MESSBEDINGUNGEN

Stickstoff-Laser ($\lambda = 337 \text{ nm}$)

Extraktionsspannung: 20 kV

Linear Mode

Mass Range: 1.000-180.000 Da

Laser-Power: 100-130 AU

Pulsed Extraktion: Off

Ion Gate: 1.000

manuelle Messung

Lineardetektor (SEV)

3.8. STATISTISCHE METHODEN

Vor einer Bearbeitung in einer externen Statistiksoftware müssen die elektrophoretischen Messdaten aus der Software 2100 Expert exportiert werden. Jedoch sind nicht die Rohdaten zugänglich. Die automatische Datenverarbeitung umfasst:

- Glättung der Daten mit einem polynomialen Filter 4. Ordnung, Filterbreite 0,5 s
- Anpassen der Migrationszeiten an die Migrationszeiten von LM und UM
- Unterdrückung der Hintergrundfluoreszenz durch Nulllinienanpassung

Exportierbar sind die Datenreihen im Intervall von 0,05 s; der letzte gegebene Datenpunkt ist immer bei Sekunde 52,95, der erste Datenpunkt variiert von Messung zu Messung und liegt zwischen der 13. und 15. Sekunde.

3.8.1. HIERARCHISCHE CLUSTERANALYSE

Die Exportierten Datenreihen müssen für das Programm Feature Extractor³³ aufgearbeitet werden (Zusatzinformation entfernen und kommagetrennte Wertetabellen), alle für eine statistische Auswertung zu benutzenden Dateien werden dann aus einem Ordner gemeinsam geöffnet. Bereiche mit Signalmaxima werden ausgewählt und daraus ein Datensatz mit den wahlweise maximalen oder durchschnittlichen Intensitäten innerhalb der gewählten Bereiche erzeugt.

Dieser Datensatz wird im Statistikprogramm DataLab³⁴ einer Clusteranalyse unterworfen. Als Distanzmaß stehen Euklidische Distanz, Quadratischer Euklidischer Abstand, Manhattan-Distanz und Jaccard-Distanz zur Verfügung.

Die Cluster-Methoden stehen Single Linkage, Complete Linkage, Average Linkage, Ward's Methode oder Flexible Strategy zur Verfügung. Die Daten können unskaliert eingesetzt, oder zuvor standardisiert werden.

Nicht alle, in Feature Extractor angelegten Features müssen zur Clusteranalyse beitragen – durch Optimierung der, zur Clusteranalyse herangezogenen, Features kann das Ergebnis verbessert werden.

Den Clustern können Klassen zugeordnet werden, die mit jeweils unterschiedlichen Klassenfarben hervorgehoben werden (vgl. Abb. 55).

3.8.2. HAUPTKOMPONENTENANALYSE

Der, wie in 3.8.1. im Feature Extractor erzeugte Datensatz kann entweder anstatt, oder nach einer erfolgten Clusteranalyse einer PCA unterzogen werden. Erfolgt die PCA nach einer Clusteranalyse, so werden die Farbcodes für die zugeordneten Klassen übernommen (vgl. Abb. 56ff).

Die PCA kann entweder direkt zur Statistischen Auswertung herangezogen werden, oder als Instrument zur Komprimierung des Datensatzes eingesetzt werden.

Zur Komprimierung des Datensatzes wird abgewogen, wie viel die jeweiligen Hauptkomponenten zur Gesamtvarianz des Datensatzes beitragen. Wird schon mit wenigen Hauptkomponenten nahezu die gesamte Varianz abgebildet, so können die weiteren Hauptkomponenten aus dem Datensatz entfernt werden.

Eine Gruppierung der Daten kann in den Score-Plots verfolgt werden, indem die Daten auf eine Ebene projiziert werden, die durch die Scores der ersten beiden Hauptkomponenten aufgespannt wird. Im Plot der Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten kann abgelesen werden, welche Features wie viel zu den beiden abgebildeten Hauptkomponenten beitragen (die relevanten Features befinden sich weit entfernt vom Ursprung). Features, die zu keinem der relevanten Hauptkomponenten (vgl. Komprimierung des Datensatzes) beitragen, können als überflüssig betrachtet werden. Diese Erkenntnis kann in die Auswahl der Features für die Clusteranalyse einfließen.

3.8.3. VISUELLE ZUORDNUNG

Neben Methoden der Statistik kann die Zuordnung der Messsignale auf der CGE-am-Chip zu den GUEs durch visuellen Vergleich erfolgen. Voraussetzung ist ein genügend großer Datensatz an Weizensorten, in dem verschiedene Kombinationen an GUEs vorkommen. Außerdem müssen die GUEs der jeweiligen Weizensorten bekannt sein.

Aus diesem Datensatz wird ein Satz an CGE-am-Chip-Messungen von Weizensorten gewählt, in dem jede HMW-GUE-Kombination je einmal vorkommt. Durch Vergleich der Elektropherogramme wird eine Liste erstellt, die allen HMW-GUE eine/mehrere Bereiche der Migrationszeit bzw. der Molekulargröße im Elektropherogramm zuordnet.

Jene Messungen, die nicht für die Erstellung der Liste verwendet wurden werden als Validierungsdatensatz benutzt. Nur mit Hilfe der Liste wird versucht, den Elektropherogrammen einen eindeutigen Satz an Gluteninuntereinheiten zuzuordnen. Dabei soll durchaus

berücksichtigt werden, dass bestimmte GUEs aufgrund der Genetik immer paarweise auftreten, so z.B. die GUEs 5+10 und 2+12.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1.AUSWAHL DES ASSAYTYPUS UND DER PROBENKONZENTRATION

Zur Auswahl des geeigneten Assaytyps wurden die drei willkürlich gewählte Weizenextrakte auf beiden zur Wahl stehenden Assaytypen vermessen. Die Probenvorbehandlung erfolgte gemäß 3.6.4.1 bzw. 3.6.4.2.

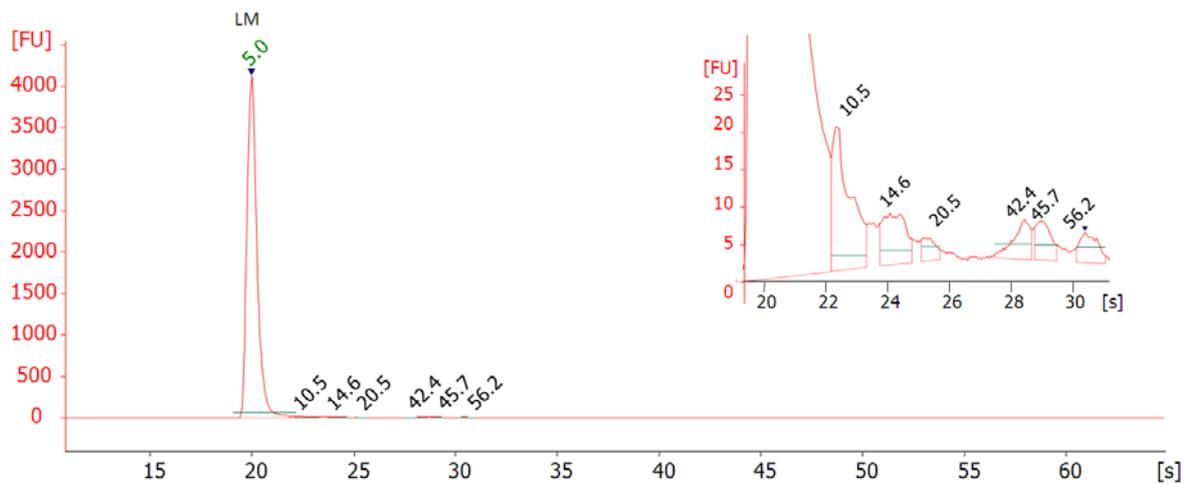


ABB. 4 ELEKTROPHERGRAMM DER METHODE B, PROTEIN 250 HIGH SENSITIVITY ASSAY VON CAPO (PROBE 5), KONZENTRIERTE PROBE

Im Elektropherogramm der Methode B, Abb. 4 ist außer dem LM kein einziges Signal, in ausreichend gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis vorhanden.

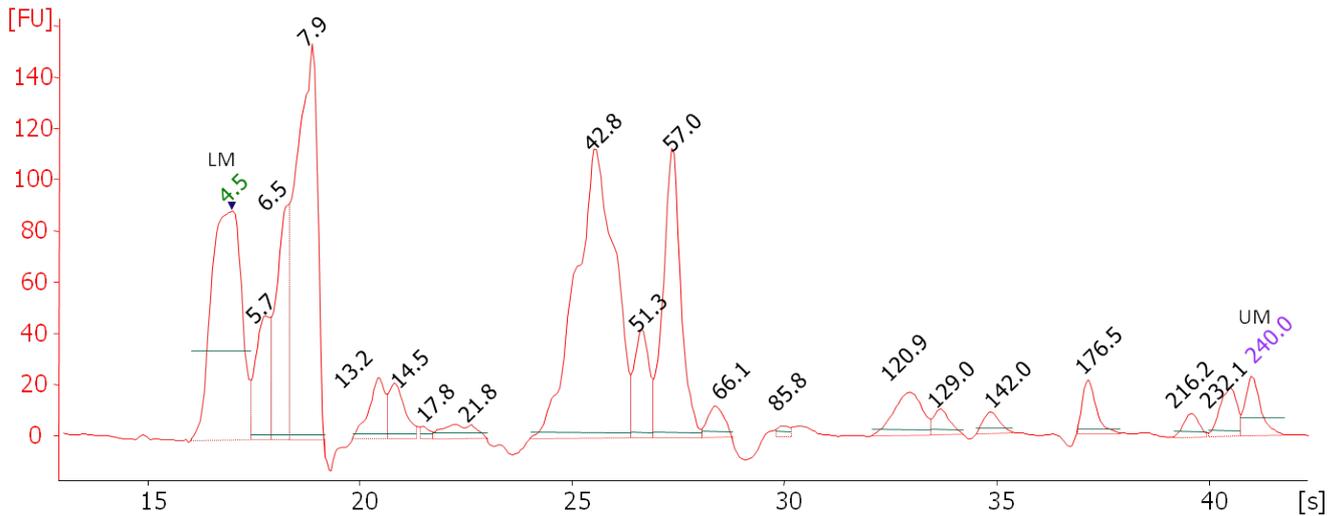


ABB. 5 ELEKTROPHERGRAMM DER METHODE A, PROTEIN 230 ASSAY VON CAPO (PROBE 5), KONZENTRIERTE PROBE

Das Elektropherogramm der Methode A, Abb. 5 zeigt viele Signale im Bereich zwischen dem LM und UM. Das teilweise negative Fluoreszenzsignal weist jedoch darauf hin, dass jeweils davor eine zu hohe Proteinkonzentration im System vorhanden war.

Um die ideale Probenkonzentration für die CGE-am-Chip zu eruieren, wurden Weizenextrakte 1:1 und 1:10 verdünnt mit UHQ vermessen (nur Elektropherogramm mit 1:1 Verdünnung hier gezeigt).

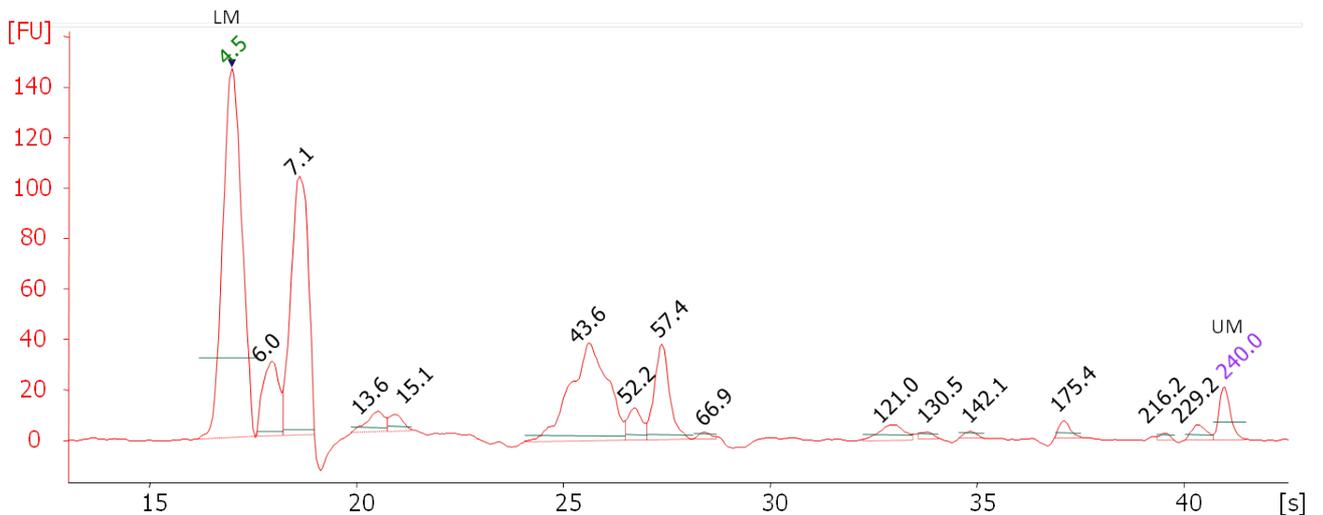


ABB. 6 ELEKTROPHERGRAMM DER METHODE A, PROTEIN 230 ASSAY VON CAPO (PROBE 5), ASSAY, EXTRAKT VERDÜNNT 1:1 MIT UHQ

Abb. 6 zeigt ein Elektropherogramm der Methode A von einem 1:1 verdünnten Weizenextrakt. Die Intensität der Signale im höheren Massenbereich, wo die Signale der Gluteninuntereinheiten vermutet werden, ist signifikant gesunken. Negative Signale sind deutlich zurückgegangen, und

bei konzentriertem Weizenextrakt überlappende Signale sind jetzt basisliniengetrennt. Jedoch ist der Verlust an Signalintensität derart dramatisch, dass die konzentrierten Weizenextrakte als beste Probenkonzentration für CGE-am-Chip befunden wurden. In weiterer Folge wurden alle Extrakte mit dem Protein 230 Assay ohne Verdünnung vermessen und ausgewertet.

4.2. TECHNISCHE REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit der, aus der Migrationszeit ermittelten Molekülgröße von Weizenextrakten bei Messung mittels CGE-am-Chip, Methode A (Protein 230 Kit) soll untersucht werden.

Hierfür wird für die Weizensorte Capo, (Probe 02) die Intra- und Interchipreproduzierbarkeit von jeweils drei Messungen auf zwei Chips ermittelt. Eine ausführliche Diskussion der Reproduzierbarkeit sowohl der Molekülgröße als auch der Signalhöhe erfolgt im Kapitel 4.4.1.

Als statistischer Kennwert der Veränderung der Messwerte wurde der Variabilitätskoeffizient (%CV) ausgewählt, der sich aus dem Mittelwert (Avg) durch die Standardabweichung (STD) errechnet.

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens wurden die Molekülgrößen der entsprechenden Banden/Signale herangezogen. Bei der Molekülgröße handelt es sich um eine abgeleitete Größe, die durch Vergleich mit Migrationszeiten von Standardproteinen bekannter Größe errechnet wird und damit auch mit gewisser Vorsicht zu handhaben sind..

In Abb. 7 ist das simulierte Gelelektrophoresebild der Weizensorte Capo (Probe 2) dargestellt, wie es mit der Software Expert 2100 erstellt werden kann. LM und UM sind grün bzw. violett dargestellt. Die Signalintensität wird in der fiktiven CBB-Färbung gezeigt und negative Intensitäten werden als weiße Banden dargestellt. In dieser Darstellungsform treten Laufzeitunterschiede besonders gut zu Tage.

Drei Banden wurden zur Untersuchung der technischen Reproduzierbarkeit ausgewählt, sie sind durchnummeriert in Abb. 7 dargestellt. Die intensive erste Bande entspricht dem Gliadinsignal, die zweite Bande hat die Laufzeit einer leichten HMW-GUE und die dritte Bande repräsentiert eine sehr schwere HMW-GUE.

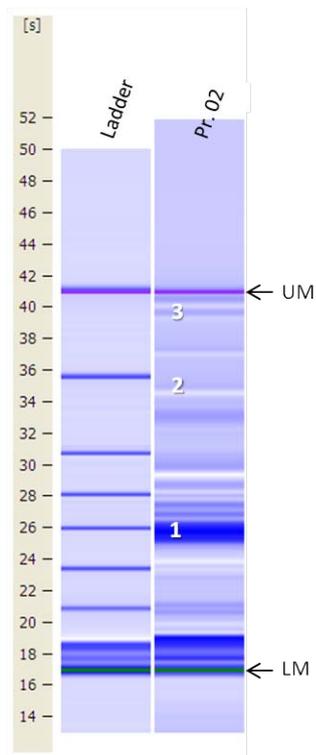


ABB. 7 SIMULIERTES GELBILD DER PROBE 02 (CAPO), VON DER ANHAND DER DREI GEKENNZEICHNETEN SIGNALE DIE INTRA- UND INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT ERMITTELT WURDE.

In Tab. 7 sind die Intrachipreproduzierbarkeit – jeweils drei Messungen pro Chip und die Interchipreproduzierbarkeit zweier Chips an Hand der drei ausgewählten Banden dargestellt.

		IntraChipA	IntraChipB	Interchip
Bande Nr.	MigT [s]	%CV	%CV	%CV
1	ca. 26	1.3	0.8	1.0
2	ca. 35	1.1	0.5	0.8
3	ca. 38	0.8	0.3	0.6

TAB. 7 INTRA- UND INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT VON WEIZEN AUF CGE-AM-CHIP DREIER AUSGEWÄHLTER SIGNALE.

Der %CV erreicht höchstens 1,3 für das Gliadinsignal. Für die, im Rahmen dieser Arbeit besonders interessanten HMW-GUE beträgt der %CV sogar nur höchstens 1.1. Die Werte der Interchipreproduzierbarkeit liegen in allen drei Fällen zwischen jenen der beiden ermittelten Intrachipreproduzierbarkeiten. Laut Herstellerangaben³⁵ beträgt die Reproduzierbarkeit der Größenordnung 3 %CV, was in jedem Fall unterschritten werden konnte.

4.3. HALTBARKEITSSTUDIE DES PROBENMATERIALS

4.3.1. DIE HALTBARKEIT DER WEIZENEXTRAKTE BEI 4°C

Es sollte untersucht werden, wie lange Weizenkornextrakte (3.5.1.1 Einstufige Extraktion), die bei 4°C gelagert sind mittels CGE-am-Chip vermessen werden können, bzw. wie sich die Lagerzeit auf die Messung auswirkt.

Die maximale Lagerzeit der Stammlösung der Extraktionslösung (Weizen, einstufig) (3.3.1) – vor der Zugabe von 2-Mercaptoethanol - ist mit 2 Monaten bei 4°C angegeben.⁸ Deshalb wurde der Endpunkt der Haltbarkeitsstudie bei 4°C auf 8 Wochen festgesetzt.

Wie in Abb. 9 erkennbar ist, treten bei der Messung der frischen Extraktionslösung im für die Messung relevanten Laufzeitbereich zwischen 22 und 45 s keine Störsignale auf.

In Abb. 9 sieht man den gleichen Extraktionsmix, gemessen nach 8 Wochen Lagerung bei 4°C. Einzig eine Erhöhung der Basislinie bei Laufzeit ≈ 22 s ist entsprechend den Detektionskriterien (Slope, ...) als Signal erkannt worden, sodass sie automatisch annotiert wird. Ansonsten treten keinerlei Störsignale auf.

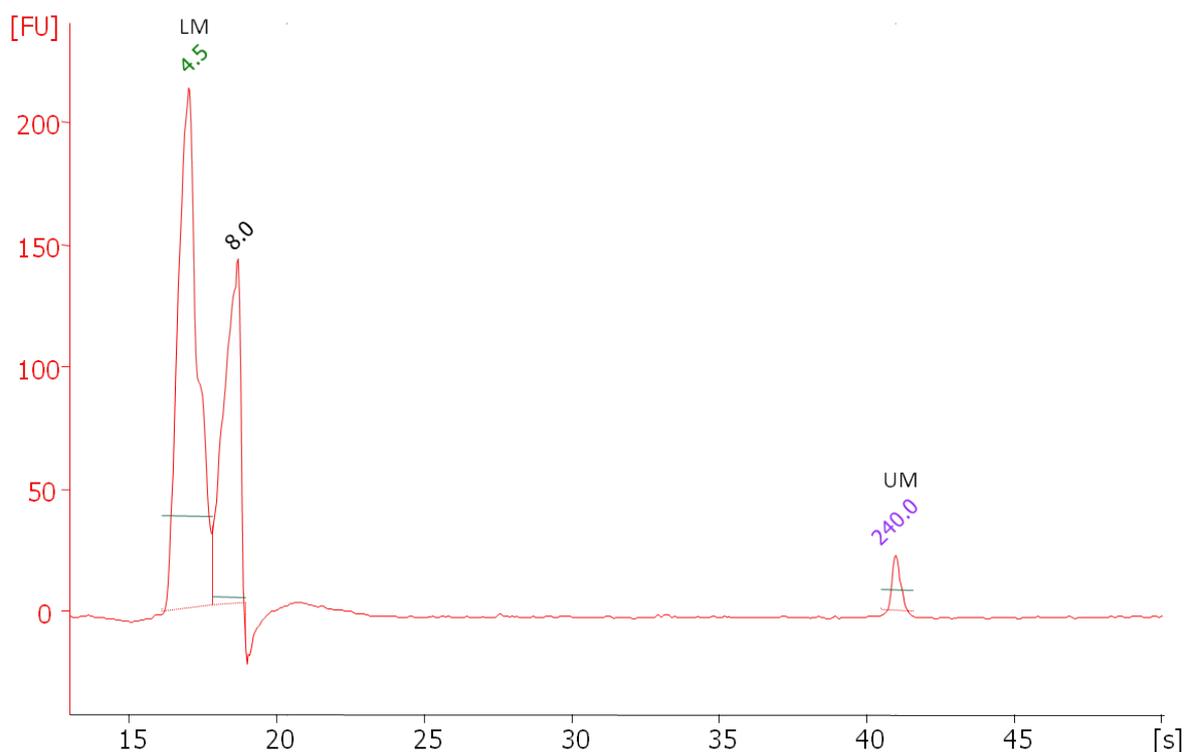


ABB. 8 ELEKTROPHEROGRAMM DER EXTRAKTIONS-LÖSUNG (WEIZEN, EINSTUFIG), 1:1 VERDÜNNT MIT UHQ NACH 2 TAGEN LAGERUNG BEI 4°C.

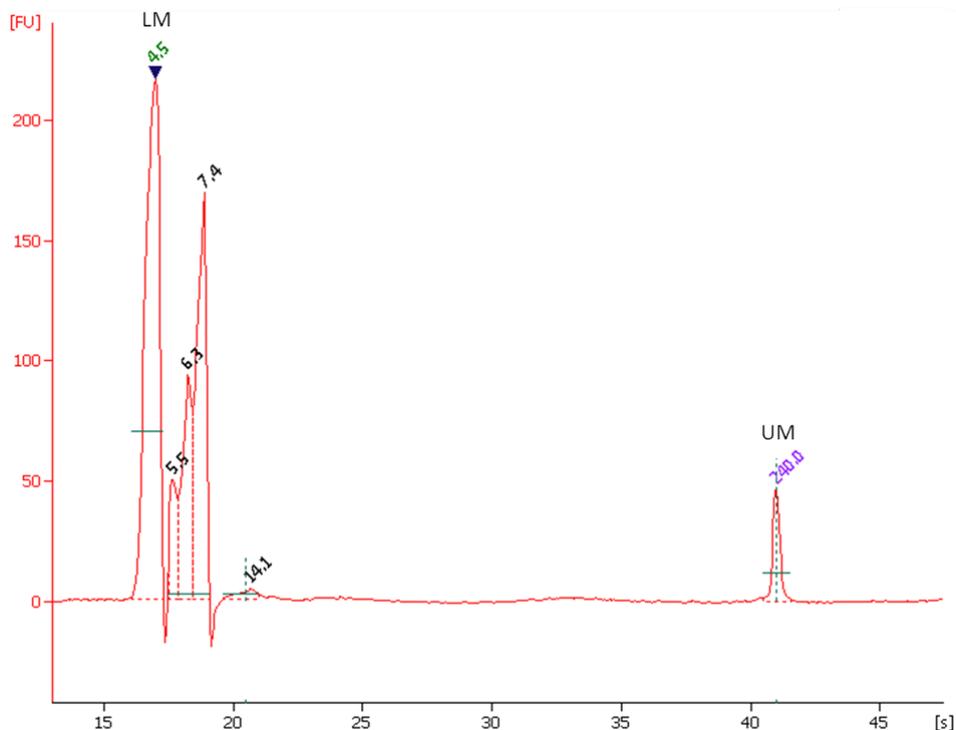


ABB. 9 ELEKTROPHEROGRAMM DER EXTRAKTIONS-LÖSUNG (WEIZEN, EINSTUFIG) NACH 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C

Drei Weizensorten (Capo – Probe 2, Vitus – Probe 13 und Mulan – Probe 30) wurden ausgewählt, für die eine Untersuchung der Haltbarkeit durch Ermittlung der %CVs der Migrationszeit sowie der zeitkorrigierten Fläche unter der Messkurve an Hand von repräsentativen Messsignalen erfolgte. Der Begriff „zeitkorrigierte Fläche“ stellt jene Peakfläche dar, die sich nach Korrektur des Elektropherogramms durch Abstimmung der internen Marker, LM und UM, mit dem externen Standard (Proteinladder) ergibt.

Die Abbildungen Abb. 10, Abb. 12 und Abb. 14 zeigen die überlagerten Elektropherogramme der nach 2, 4, 6 und 8 Wochen gemessenen Weizensorten. Nur der relevante Abschnitt der Elektropherogramme ist dargestellt, sowie die für die statistische Auswertung herangezogenen Signale, welche mit einer Nummer versehen wurden.

Auffällig ist, dass die Messung nach zwei Wochen Lagerung bei 4°C immer die geringste Intensität aufweist. Während für Capo (Probe 02) die bei -20°C gelagerte Probe eine ähnlich geringe Intensität aufweist, liegt sie bei Vitus (Probe 13) im Bereich der vier bzw. acht Wochen gelagerten Proben. Im Falle von Mulan (Probe 30) weist sie sogar die höchste Intensität auf.

Die Abb. 11, Abb. 13 und Abb. 15 zeigen ein simuliertes Gelelektrophoresebild der jeweiligen Weizensorten zu allen Messzeitpunkten – es ist erkennbar, dass die Marker (LM und UM) richtig zugeordnet wurden bzw. keiner weiteren, manuellen Korrektur bedürfen.

Als statistischer Kennwert der Veränderung der Messwerte durch längere Lagerung wurde der %CV ausgewählt. Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens wurden die Molekülgrößen der entsprechenden Banden/Signale herangezogen.

In Tab. 8, Tab. 10 und Tab. 12 sind die Molekülgrößen in Kilodalton (kDa) der ausgewählten Signale der drei Weizensorten dargestellt, sowie deren Avg, STD und der %CV. Für die Weizensorten Capo und Vitus wird in der letzten Spalte der %CV der Interchipreproduzierbarkeit (4.4.1) dargestellt, womit ein direkter Vergleich des Lagerungseffektes mit der Reproduzierbarkeit der Messmethode ermöglicht wird.

Zur Untersuchung der Auswirkung der Lagerung auf die Signalintensität wurde die zeitkorrigierte Fläche des Messsignals ausgewählt. Auf Grund von uneinheitlicher automatischer Integration musste fallweise manuell nachintegriert werden.

In Tab. 9, Tab. 11 und Tab. 13 sind, parallel zu den Tabellen der Molekülgröße, die zeitkorrigierte Fläche der ausgewählten Signale der drei Weizensorten, Avg und STD sowie der %CV dargestellt. Wieder sind für die Weizensorten Capo und Vitus die %CVs der Interchipreproduzierbarkeit (4.4.1) der entsprechenden Signale gegeben.

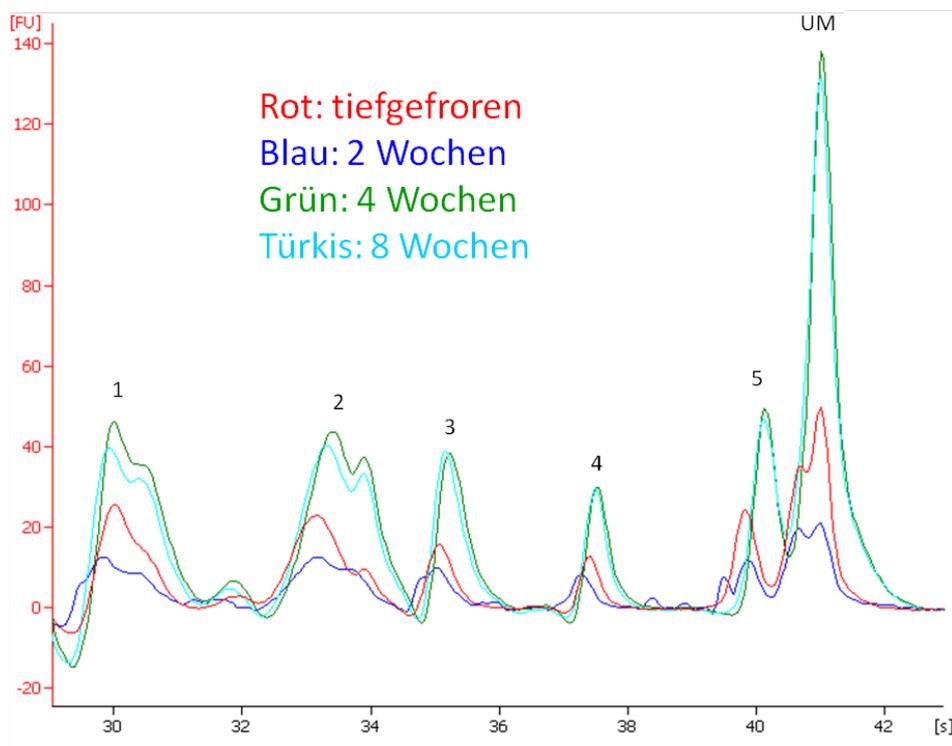


ABB. 10 ÜBERLAGERTE ELEKTROPHEROGRAMME DER PROBE 2 (CAPO) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE. 5 MESSSIGNALE WURDEN FÜR DIE NÄHERE UNTERSUCHUNG DER HALTBARKEIT AUSGEWÄHLT.

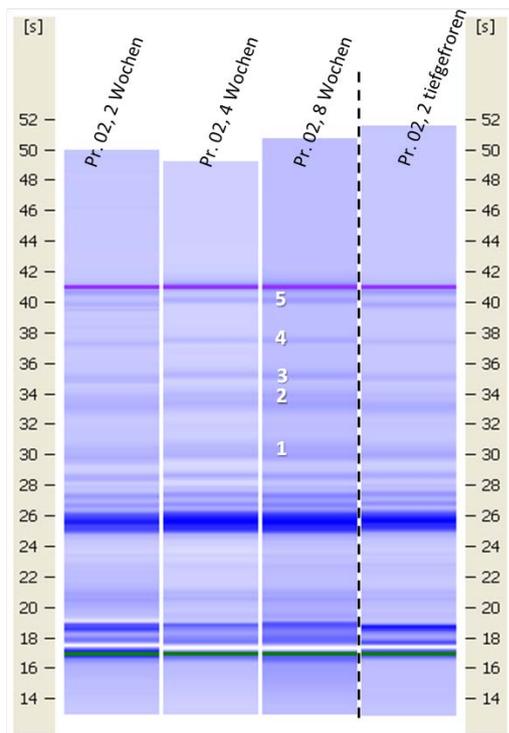


ABB. 11 SIMULIERTES GELBILD DER PROBE 02 (CAPO) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE.

Signal Nr.	Gefr.	2W	4W	8W	Avg	STD	%CV	%CV(Reproduz.)
1	87	84.3	87.1	86	86.10	1.30	1.5	1.1
2	123.3	123.2	126.3	124.8	124.40	1.46	1.2	1.2
3	144.6	144.3	147.1	146	145.50	1.30	0.9	1.1
4	181.1	178.5	182.7	182.7	181.25	1.98	1.1	1.7
5	220.9	221.6	225.7	225.1	223.33	2.43	1.1	1.6

TAB. 8 AUS DER MIGRATIONSZEIT ABGELEITETE MOLEKÜLGRÖßEN IN KDA DER PROBE 02 (CAPO) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE VON 5 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN. DER %CV DIESER MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN LAGERZEITEN WIRD MIT DEM %CV DER INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT (4.4.1) FÜR DAS ENTSPRECHENDE MESSSIGNAL GEGENÜBERGESTELLT.

Signal Nr.	Gefr.	2W	4W	8W	Avg	STD	%CV	%CV(Reproduz.)
1	62	26	100.1	72	65.025	30.61	47.1	18.5
2	58.8	25.5	79.9	74.8	59.75	24.54	41.1	26.1
3	21.9	16.2	55.3	50.8	36.05	19.85	55.1	30.2
4	12.3	9	32.9	32.9	21.775	12.92	59.3	35.7
5	27.5	11	55.3	54.2	37	21.58	58.3	24.1

TAB. 9 TABELLE DER ZEITKORRIGIERTEN FLÄCHEN VON 5 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN DER PROBE 13 (VITUS) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE. DER %CV DIESER MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN LAGERZEITEN WIRD MIT DEM %CV DER INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT (4.4.1) FÜR DAS ENTSPRECHENDE MESSSIGNAL GEGENÜBERGESTELLT.

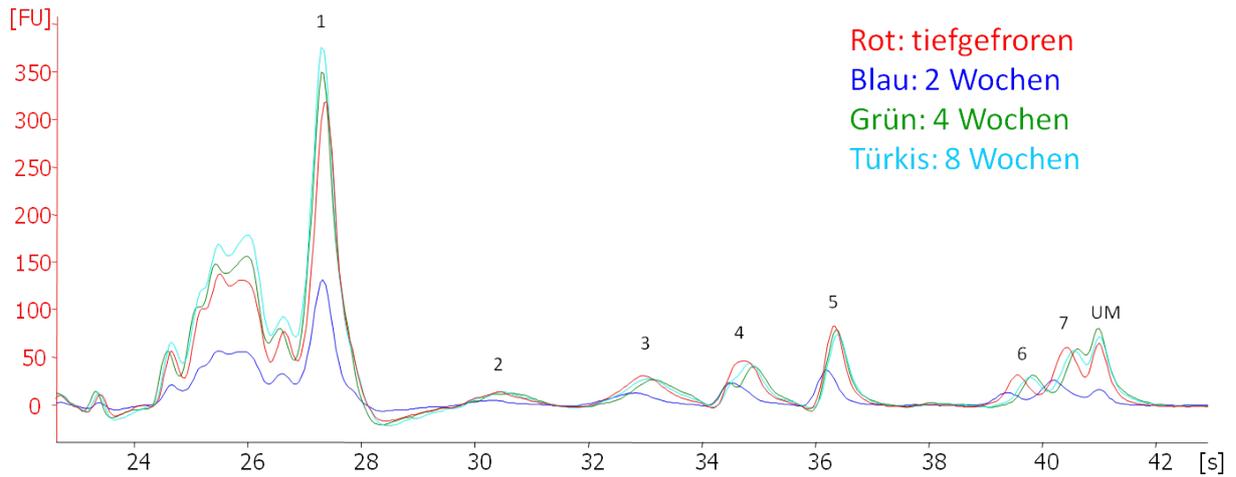


ABB. 12 ÜBERLAGERTE ELEKTROPHEROGRAMME DER PROBE 13 (VITUS) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE. 7 MESSSIGNALE WURDEN FÜR DIE NÄHERE UNTERSUCHUNG DER HALTBARKEIT AUSGEWÄHLT.

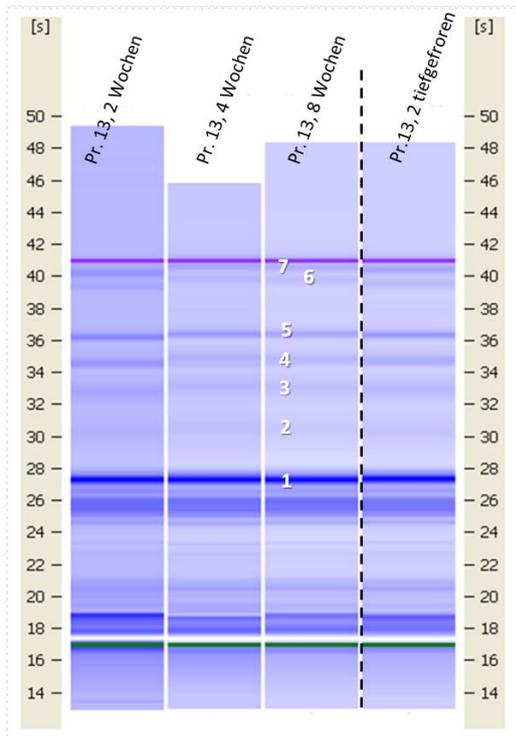


ABB. 13 SIMULIERTES GELBILD DER PROBE 13 (VITUS) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE.

Signal Nr.	Gefr.	2W	4W	8W	Avg	STD	%CV	%CV(Reproduz.)
1	57.9	57.2	57.5	56.6	57.30	0.55	1.0	1.1
2	92.9	91.8	95.5	92.5	93.18	1.62	1.7	1.1
3	121.7	119.8	124.3	122	121.95	1.84	1.5	0.9
4	141.6	138.5	144	142.1	141.55	2.28	1.6	0.7
5	163.8	160.8	164.9	164	163.38	1.78	1.1	0.9
6	216.1	213.1	221.4	219.7	217.58	3.71	1.7	0.7
7	230.3	226.9	233.8	232.5	230.88	3.02	1.3	0.8

TAB. 10 AUS DER MIGRATIONSZEIT ABGELEITETE MOLEKÜLGRÖßEN IN KDA DER PROBE 13 (VITUS) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE VON 7

AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN. DER %CV DIESER MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN LAGERZEITEN WIRD MIT DEM %CV DER INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT (4.4.1) FÜR DAS ENTSPRECHENDE MESSSIGNAL GEGENÜBERGESTELLT.

Signal Nr.	Gefr.	2W	4W	8W	Avg	STD	%CV	%CV(Reproduz.)
1	632.6	243.6	541.6	691.6	691.6	198.97	28.8	15.2
2	35.6	15.1	9.5	35.3	35.3	13.56	38.4	59.1
3	98.6	40.2	10.7	99	99	44.03	44.5	39.8
4	96.1	40.9	37.5	90	90	31.22	34.7	73.1
5	101.9	44	77.60	97.8	97.8	26.44	27.0	69.4
6	42.30	17.6	35.6	40	40	11.20	28.0	49.0
7	81.7	39.7	59.8	72	72	18.11	25.1	68.9

TAB. 11 TABELLE DER ZEITKORRIGIERTEN FLÄCHEN VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN DER PROBE 13 (VITUS) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE. DER %CV DIESER MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN LAGERZEITEN WIRD MIT DEM %CV DER INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT (4.4.1) FÜR DAS ENTSPRECHENDE MESSSIGNAL GEGENÜBERGESTELLT.

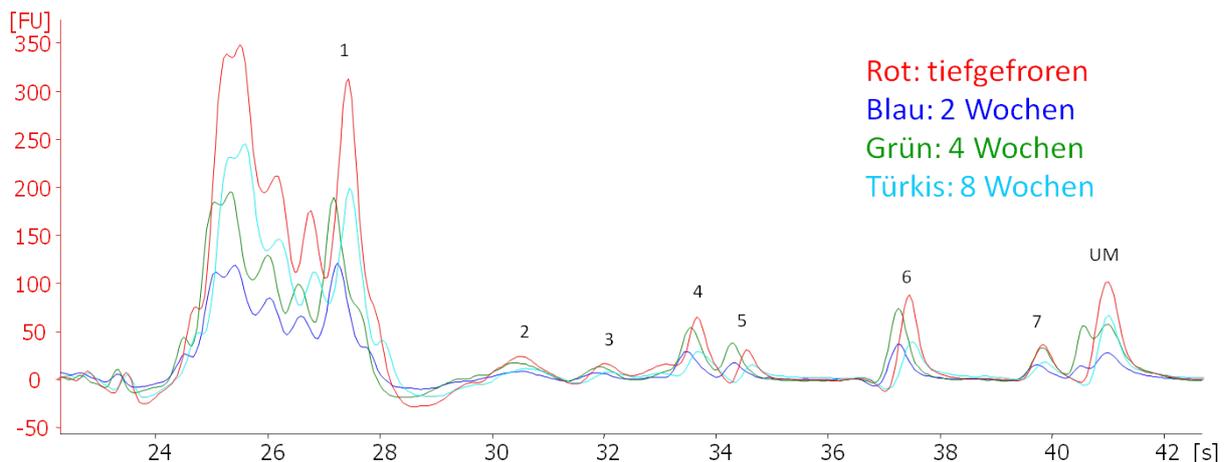


ABB. 14 ÜBERLAGERTE ELEKTROPHERGRAMME DER PROBE 30 (MULAN) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE. 7 MESSSIGNALE WURDEN FÜR DIE NÄHERE UNTERSUCHUNG DER HALTBARKEIT AUSGEWÄHLT.

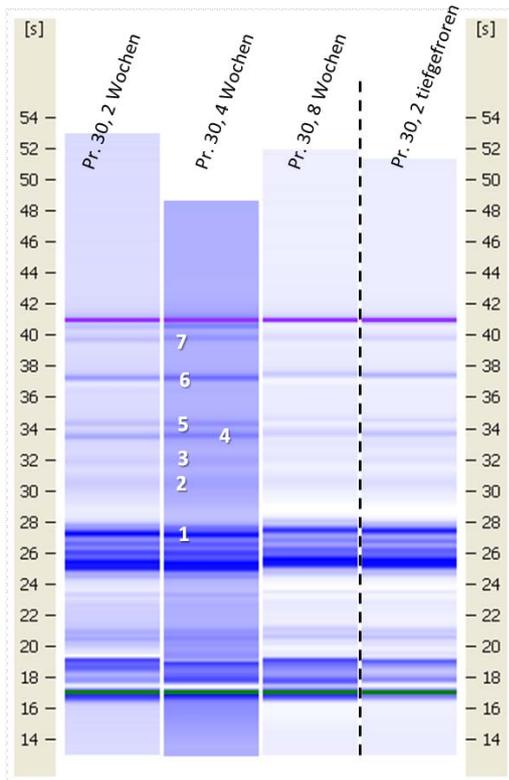


ABB. 15 SIMULIERTES GELBILD DER PROBE 30 (MULAN) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE.

Signal Nr.	Gefr.	2W	4W	8W	Avg	STD	%CV
1	57.8	55.9	55.6	57.4	56.68	1.09	1.9
2	93	92.8	91.3	93.3	92.60	0.89	1.0
3	110.3	108	109	110.4	109.43	1.14	1.0
4	129.1	126.3	127.3	128.6	127.83	1.27	1.0
5	139	135.5	136	139.3	137.45	1.98	1.4
6	181.9	177.6	178.1	181.7	179.83	2.29	1.3
7	220.9	218.9	220.6	220.8	220.30	0.94	0.4

TAB. 12 AUS DER MIGRATIONSZEIT ABGELEITETE MOLEKÜLGRÖßEN IN KDA DER PROBE 30 (MULAN) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN PROBE. VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN WIRD DER %CV DES MESSSIGNALS BEI VERSCHIEDENEN LAGERZEITEN ERRECHNET.

Signal Nr.	Gefr.	2W	4W	8W	Avg	STD	%CV
1	620.8	237.3	340	399.6	691.6	162.09	23.4
2	66.8	16.6	17.3	30.9	35.3	23.54	66.7
3	30	8.5	9.1	13	99	10.10	10.2
4	83.50	37.9	74.9	38.5	90	23.93	26.6
5	32.6	19.1	42.9	14.6	97.8	12.91	13.2
6	91.9	39.3	87.4	38.5	40	29.36	73.4
7	38.6	17.2	39.6	13.7	72	13.73	19.1

TAB. 13 TABELLE DER ZEITKORRIGIERTEN FLÄCHEN VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN DER PROBE 30 (MULAN) NACH 2, 4 UND 8 WOCHEN LAGERUNG BEI 4°C SOWIE DER BEI -20°C GELAGERTEN

PROBE. VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN WIRD DER %CV DES MESSIGNALS BEI VERSCHIEDENEN LAGERZEITEN ERRECHNET.

Auch nach 8 Wochen Lagerung der Weizenextrakte bei 4°C ist die elektroforetische Messung durchführbar. Die allgemeine Intensität des Messsignals nimmt nicht signifikant ab, sondern liegt teilweise höher als bei der Vermessung „frischerer“ Extrakte.

Die Variabilität des Migrationsverhaltens ist sehr gering und entspricht dem Betrage nach etwa der Reproduzierbarkeit der Methode (vgl. 4.4.1 Reproduzierbarkeitsstudie), sodass auch noch nach achtwöchiger Lagerung verlässliche qualitative Information aus der kapillarelektrophoretischen Messung gewonnen werden kann.

Die Variabilität der Signalintensität ist dramatisch höher, während man bei Capo (Probe 02) noch eine Verdopplung der Variabilität nach Lagerung im Vergleich zur Reproduzierbarkeit der Methode feststellen kann, so ist bei Vitus (Probe 13) kein eindeutiger Unterschied zur Reproduzierbarkeit der Methode zu erkennen. Gesichert lässt sich nur aussagen, dass die Reproduzierbarkeit der Signalintensität sehr gering ist, und durch lange Lagerung nur noch unwesentlich verschlechtert wird.

Nach acht Wochen Lagerung treten jedoch Störungen bei der kapillarelektrophoretischen Messung am Chip auf – drei der vier Chips mussten wiederholt werden, bis alle 38 Proben vermessen werden konnten. Als Ursache der Störung wird eine Agglomerat- oder sonstige Partikelbildung vermutet.

Die niedrige Signalintensität der Messungen nach zwei Wochen Lagerzeit ist nicht nur für die zur näheren statistischen Betrachtung ausgewählten Weizensorten zu beobachten, sondern bei allen 38 vermessenen Proben. Die Ursache wird nicht in einem elektroforetischen Effekt vermutet, sondern könnte ein Artefakt durch noch ungeübte Handhabung der Methode darstellen, da die Messung nach zweiwöchiger Lagerzeit die erste, für alle 38 Proben durchgeführte Messung war.

4.3.2. HALTBARKEIT BEI -20°C

Bei der Haltbarkeitsstudie bei -20°C sollte untersucht werden, wie sich das wiederholte Auftauen und Einfrieren auf die Weizenextrakte auswirkt. Die Weizenextrakte wurden nach Lagerung bei -20°C durch dreißigminütiges Stehen bei Raumtemperatur aufgetaut und kurz am Vortex-Gerät geschüttelt. Je ein Aliquot (4 µL) wurde zur Messung entnommen und die Proben wieder bei -20°C bis zur nächsten Messung (mind. einen Tag später) gelagert.

Wie alle Weizenproben wurde auch die Extraktionslösung (Weizen, einstufig) drei Frier-Auftau-Zyklen unterzogen. Das Elektropherogramm der Extraktionslösung nach dem dritten Auftauen

(Abb. 16) entspricht im Messbereich von 22 bis 45 s weniger dem Grundliniensignal, als das entsprechende Elektropherogramm der Lagerstudie bei 4°C (Abb. 9). Unter Beibehaltung der Standardeinstellungen der automatischen Integration werden automatisch drei Messsignale im Bereich von 25 s annotiert.

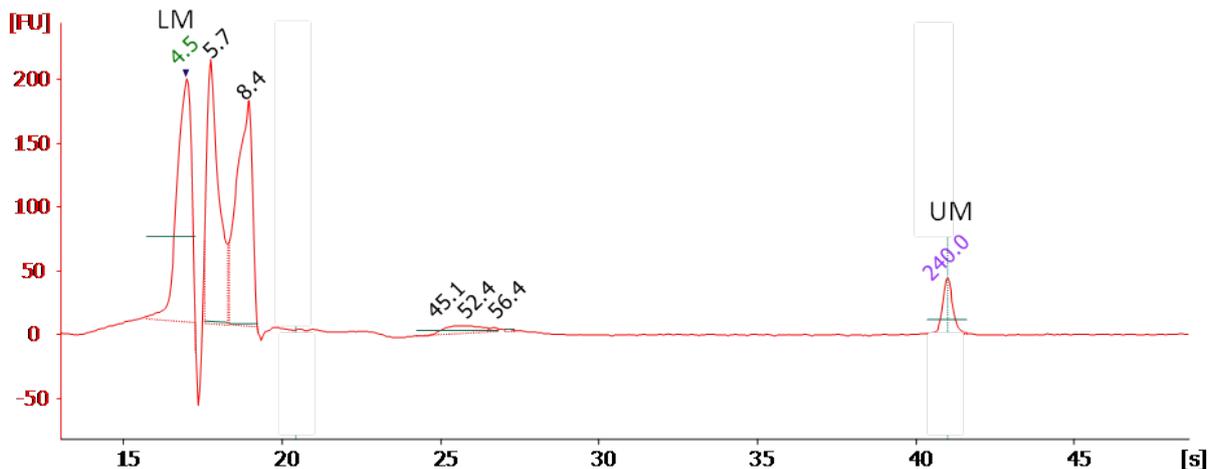


ABB. 16 ELEKTROPHEROGRAMM DER EXTRAKTIONS-LÖSUNG (WEIZEN, EINSTUFIG) NACH DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN. ZUSÄTZLICH ZU DEN SYSTEMPEAKS (LM, UM SOWIE LÖSUNGSMITTELPEAKS) WURDEN AUCH ANDERE SIGNALE ANNOTIERT.

Dieselben drei Weizensorten (Capo- Probe 2, Vitus – Probe 13 und Mulan – Probe 30), die auch für die Haltbarkeitsstudie bei 4°C herangezogen wurden (4.3.1 Die Haltbarkeit der Weizenextrakte bei 4°C), wurden auch zur Ermittlung der Resistenz gegen Frier-Auftau-Zyklen ausgewählt. Parallel dazu wurden die %CVs der Molekülgröße (als Funktion der Migrationszeit) und der Signalintensität (zeitkorrigierte Fläche unter der Kurve) der Messungen nach dem 1., 2. und 3. Auftauen berechnet.

In den Abb. 17, Abb. 19 und Abb. 21 sind die überlagerten Elektropherogramme jeweils einer Weizenprobe nach den drei Frier-Auftau-Zyklen dargestellt. Die Abb. 18, Abb. 20 und Abb. 22 zeigen das entsprechende simulierte Gelbild. Für Probe 02, Capo konnten nach dem dritten Auftauen für drei der fünf ausgewählten Signale keine Signalmaxima mehr gemessen werden, sondern nur Minima kurz vor den erwarteten Maxima (Abb. 17 und Abb. 18). Für die entsprechenden Signale konnte so auch kein %CV ermittelt werden (Tab. 14 und Tab. 15).

Die Tab. 14 bis Tab. 19 zeigen, wieder parallel zu Kapitel 4.3.1 (Die Haltbarkeit der Weizenextrakte bei 4°C), die %CVs der Migrationszeit (Molekülgröße) und der Signalintensität (Fläche unter der Kurve) der drei Weizensorten bei steigender Zahl an Frier-Auftau-Zyklen. Für die Proben 02 (Capo) und 13 (Vitus) ist wieder der %CV der Interchipreproduzierbarkeit zwecks Orientierung hintangestellt.

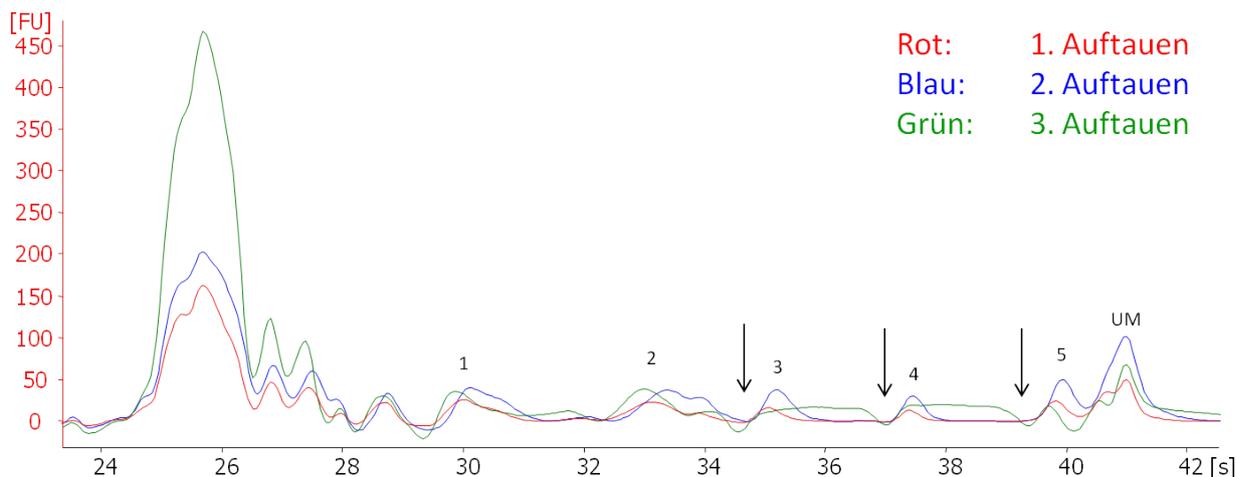


ABB. 17 ÜBERLAGERTE ELEKTROPHEROGRAMME DER PROBE 02 (CAPO) DER DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN. 5 MESSSIGNALE WURDEN FÜR DIE NÄHERE UNTERSUCHUNG DER HALTBARKEIT AUSGEWÄHLT.

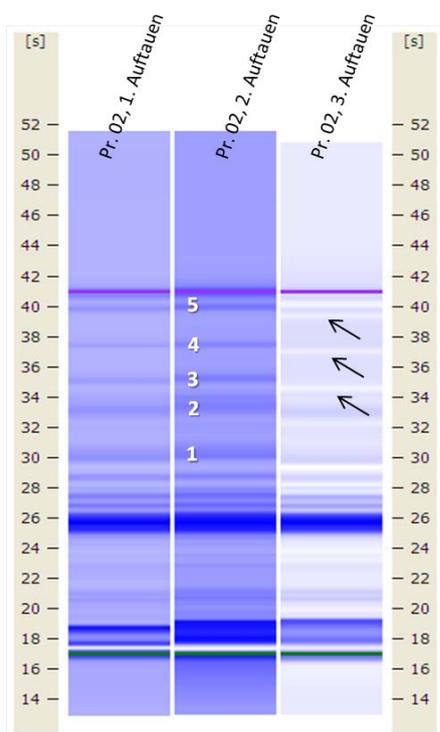


ABB. 18 SIMULIERTES GELBILD DER PROBE 02 (CAPO) DER DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN.

Signal Nr.	1. Auftauen	2. Auftauen	3. Auftauen	Avg	STD	%CV	%CV(Reproduz.)
1	87	88.7	84.3	86.67	2.22	2.6	1.1
2	123.3	125.9	120.3	123.17	2.80	2.3	1.2
3	144.6	146.2	/	145.40	/	/	1.1
4	181.1	181.9	/	181.50	/	/	1.7
5	220.9	222.5	/	221.70	/	/	1.6

TAB. 14 AUS DER MIGRATIONSZEIT ABGELEITETE MOLEKÜLGRÖßEN IN KDA DER PROBE 02 (CAPO) NACH DEN DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN VON 5 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN. DER %CV DIESER MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN LAGERBEDINGUNGEN WIRD MIT DEM %CV DER INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT (4.4.1) FÜR DAS ENTSPRECHENDE MESSIGNAL GEGENÜBERGESTELLT.

Signal Nr.	1. Auftauen	2. Auftauen	3. Auftauen	Avg	STD	%CV	%CV(Reproduz.)
1	62	26.8	40.5	43.1	17.74	41.2	18.5
2	58.8	43.4	42.9	48.36667	9.04	18.7	26.1
3	21.9	35.4	/	28.65	/	/	30.2
4	12.3	29.6	/	20.95	/	/	35.7
5	27.5	63.4	/	45.45	/	/	24.1

TAB. 15 TABELLE DER ZEITKORRIGIERTEN FLÄCHEN VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN DER PROBE 02 (CAPO) NACH DEN DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN. DER %CV DIESER MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN LAGERBEDINGUNGEN WIRD MIT DEM %CV DER INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT (4.4.1) FÜR DAS ENTSPRECHENDE MESSIGNAL GEGENÜBERGESTELLT.

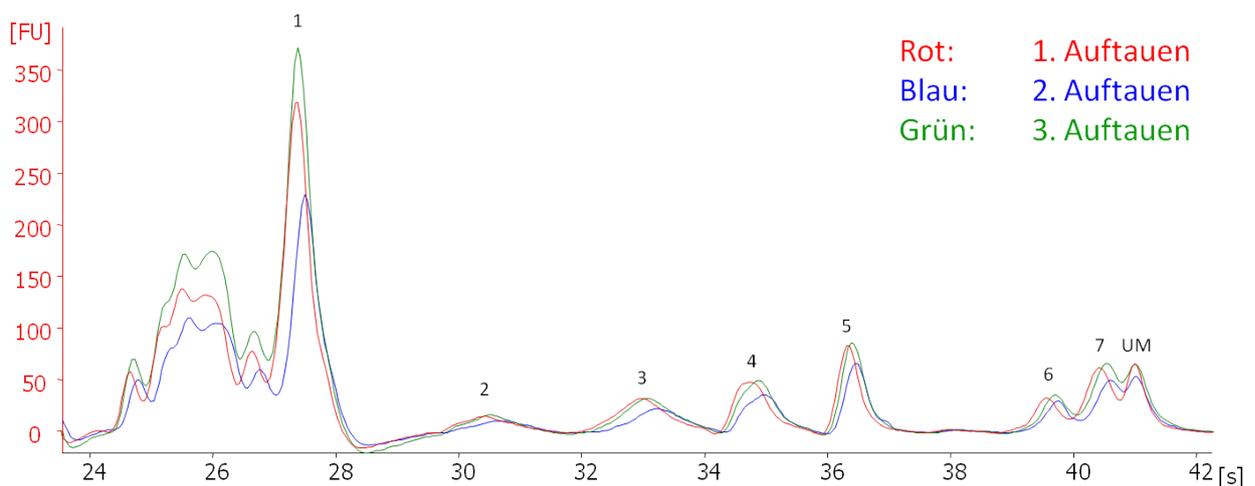


ABB. 19 ÜBERLAGERTE ELEKTROPHEROGRAMME DER PROBE 13 (VITUS) DER DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN. 7 MESSSIGNALE WURDEN FÜR DIE NÄHERE UNTERSUCHUNG DER HALTBARKEIT AUSGEWÄHLT.

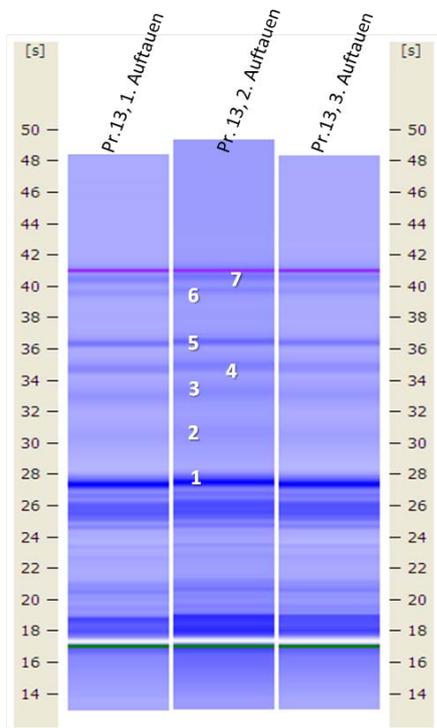


ABB. 20 SIMULIERTES GELBILD DER PROBE 13 (VITUS) DER DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN.

Signal Nr.	1. Auftauen	2. Auftauen	3. Auftauen	Avg	STD	%CV	%CV(Reproduz.)
1	57.9	58.6	57.9	58.13	0.40	0.7	1.1
2	92.9	95.5	93.8	94.07	1.32	1.4	1.1
3	121.7	124.5	122.7	122.97	1.42	1.2	0.9
4	141.6	143.9	143.3	142.93	1.19	0.8	0.7
5	163.8	165.6	164.9	164.77	0.91	0.6	0.9
6	216.1	219.5	219.2	218.27	1.88	0.9	0.7
7	230.3	233.9	232.6	232.27	1.82	0.8	0.8

TAB. 16 AUS DER MIGRATIONSZEIT ABGELEITETE MOLEKÜLGRÖßEN IN KDA DER PROBE 13 (VITUS) NACH DEN DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN. DER %CV DIESER MESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN LAGERBEDINGUNGEN WIRD MIT DEM %CV DER INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT (4.4.1) FÜR DAS ENTSPRECHENDE MESSSIGNAL GEGENÜBERGESTELLT.

Signal Nr.	1. Auftauen	2. Auftauen	3. Auftauen	Avg	STD	%CV	%CV(Reproduz.)
1	632.6	431.4	732.3	691.6	153.28	22.2	15.2
2	35.6	59.8	44.1	35.3	12.28	34.8	59.1
3	98.6	83.9	96.3	99	7.91	8.0	39.8
4	96.1	79.3	98.8	90	10.57	11.7	73.1
5	101.9	85.3	112.10	97.8	13.53	13.8	69.4
6	42.30	35.60	46.5	40	5.50	13.7	49.0
7	81.7	60.7	85.4	72	13.32	18.5	68.9

TAB. 17 TABELLE DER ZEITKORRIGIERTEN FLÄCHEN VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN DER PROBE 13 (VITUS) NACH DEN DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN. DER %CV DIESER MESSUNGEN BEI

VERSCHIEDENEN LAGERBEDINGUNGEN WIRD MIT DEM %CV DER INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT (4.4.1) FÜR DAS ENTSPRECHENDE MESSSIGNAL GEGENÜBERGESTELLT.

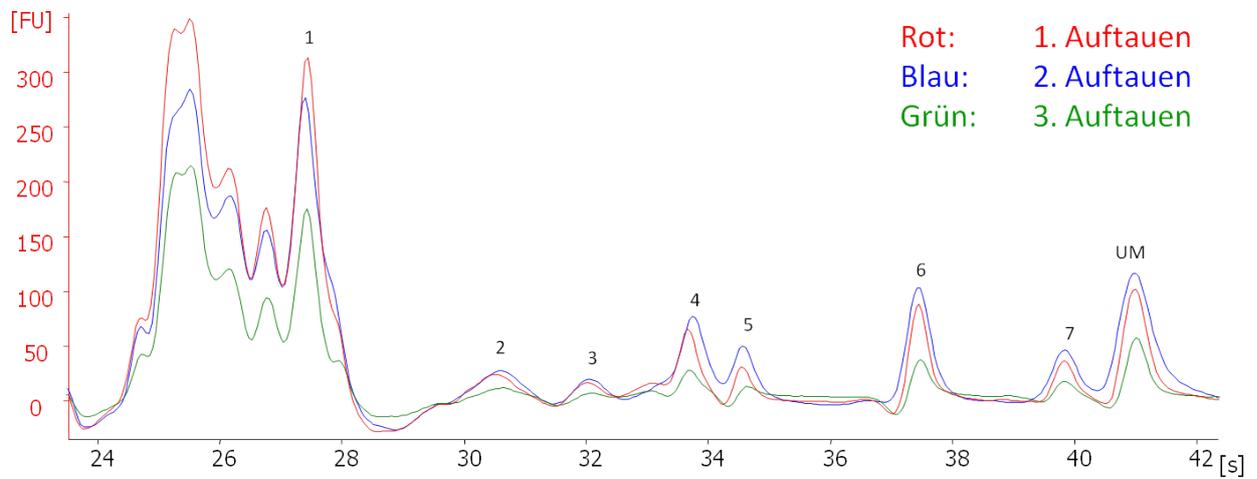


ABB. 21 ÜBERLAGERTE ELEKTROPHERGRAMME DER PROBE 30 (MULAN) DER DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN. 7 MESSSIGNALE WURDEN FÜR DIE NÄHERE UNTERSUCHUNG DER HALTBARKEIT AUSGEWÄHLT.

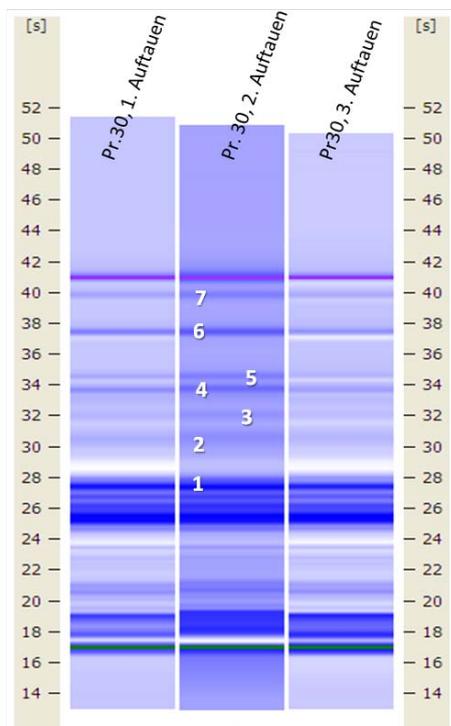


ABB. 22 SIMULIERTES GELBILD DER PROBE 30 (MULAN) DER DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN.

Signal Nr.	1. Auftauen	2. Auftauen	3. Auftauen	Avg	STD	%CV
1	57.8	57.8	57.7	57.77	0.06	0.1
2	93	94.4	94.4	93.93	0.81	0.9
3	110.3	110.8	111.1	110.73	0.40	0.4
4	129.1	129.9	129.4	129.47	0.40	0.3
5	139	139.2	139.7	139.30	0.36	0.3
6	181.9	181.2	182	181.70	0.44	0.2
7	220.9	220.9	221.2	221.00	0.17	0.1

TAB. 18 AUS DER MIGRATIONSZEIT ABGELEITETE MOLEKÜLGRÖßEN IN KDA DER PROBE 30 (MULAN) NACH DEN DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN .VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN WIRD DER %CV DES MESSSIGNALS BEI VERSCHIEDENEN LAGERBEDINGUNGEN ERRECHNET.

Signal Nr.	1. Auftauen	2. Auftauen	3. Auftauen	Avg	STD	%CV
1	620.8	513.7	321.4	691.6	151.71	21.9
2	66.8	30.4	25.6	35.3	22.53	63.8
3	30	15.7	7	99	11.61	11.7
4	83.5	125.6	30.70	90	47.55	52.8
5	32.60	67.1	11.8	97.8	27.93	28.6
6	91.9	137.5	32.9	40	52.44	131.1
7	38.6	63.40	11.5	72	25.96	36.1

TAB. 19 TABELLE DER ZEITKORRIGIERTEN FLÄCHEN VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN DER PROBE 30 (MULAN) NACH DEN DREI FRIER-AUFTAU-ZYKLEN. VON 7 AUSGEWÄHLTEN MESSSIGNALEN WIRD DER %CV DES MESSSIGNALS BEI VERSCHIEDENEN LAGERBEDINGUNGEN ERRECHNET

Ein direkter Vergleich der %CVs der Haltbarkeit bei 4°C und bei -20°C (Frier-Auftau-Zyklen) ist jedoch nicht zulässig. Zur Ermittlung der %CV bei 4°C wurden vier Messwerte herangezogen, für die drei Frier-Auftau-Zyklen jedoch nur drei. Die geringere Stabilität der Extraktionslösung bei mehrmaligem Einfrieren und Auftauen und die Tatsache, dass für die Probe 02, Capo im interessierenden Bereich der Gluteninsignale gar keine Maxima gemessen werden konnten, legt vielmehr den Schluss nahe, dass die Weizenextrakte stabiler bezüglich Lagerung bei 4°C sind, als wenn sie mehrmaligem Einfrieren und Wiederauftauen unterworfen sind.

4.4. KAPILLARGELELEKTROPHORESE-AM-CHIP

4.4.1. REPRODUZIERBARKEITSSTUDIE

An Hand von drei ausgewählten Weizensorten wurde die Reproduzierbarkeit der CGE-am-Chip, Methode A untersucht. Dabei wurde auf zwei Chips mehrmals dieselben Proben vermessen – da es sich bei den Wiederholungsmessungen jeweils um Aliquote von Extrakten desselben Weizenkorns handelt, spielt die biologische Reproduzierbarkeit in dieser Untersuchung keine Rolle.

Die Weizensorten Capo (Probe 2), Vitus (Probe 13) und Alora (Probe 33) wurden für die Reproduzierbarkeitsstudie ausgewählt, wobei, wie in Abb. 23 erkennbar, Capo und Alora je drei Mal, Vitus vier Mal pro Chip aufgetragen wurden. Sieben bzw. acht repräsentative Signale wurden ausgewählt.

Zur Berechnung der Interchipreproduzierbarkeit wurden für Capo noch die Messergebnisse vom 24. September und 27. Oktober 2009, für Vitus vom 27. Oktober, Chip 2 und 4, und für Alora jene vom 28. September und 27. Oktober 2009 mit einbezogen.

Als Intrachipreproduzierbarkeit werden in den Tab. 20, Tab. 21 und Tab. 22 die %CVs für die zwei Einzelchips, %CV (A) und %CV (B), und der Avg daraus angegeben sowie die Interchipreproduzierbarkeit der jeweiligen Kategorie.

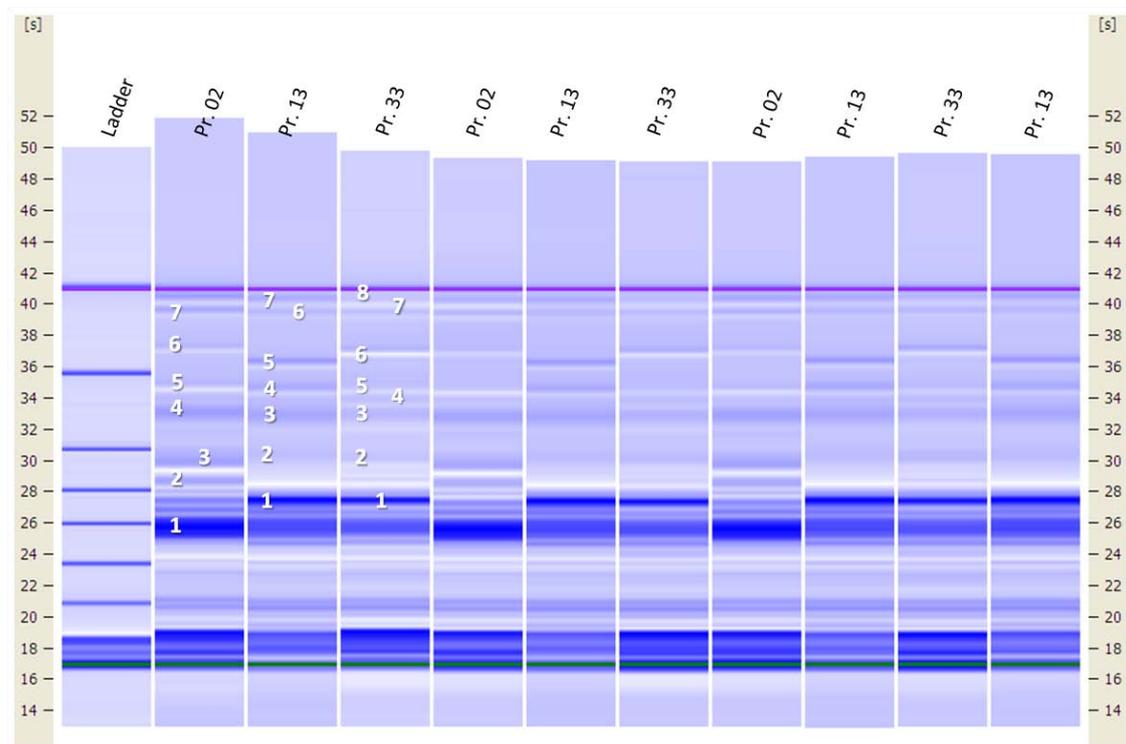


ABB. 23 SIMULIERTES GELBILD EINES DER ZWEI MESSUNGEN ZUR BERECHNUNG DER INTRACHIPREPRODUZIERBARKEIT

Signal Nr.	Size [kDa]				Time corrected area			
	%CV (A)	%CV (B)	Δ %CV	Inter %CV	%CV (A)	%CV (B)	Δ %CV	Inter %CV
1	1.3	0.8	1.0	1.6	4.6	49.0	26.8	34.0
2	1.8	1.0	1.4	2.0	11.5	58.3	34.9	31.3
3	1.6	0.5	1.1	2.2	8.5	61.1	34.8	35.5
4	1.4	0.1	0.7	1.4	10.8	66.4	38.6	38.9
5	1.1	0.5	0.8	1.4	42.6	128.8	85.7	112.9
6	0.9	0.4	0.6	1.9	52.1	91.4	71.7	103.9
7	0.8	0.3	0.6	2.0	81.2	72.0	76.6	83.7

TAB. 20 INTRA- UND INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT DER WEIZENSORTE CAPO (PROBE 02)

Signal Nr.	Size [kDa]				Time corrected area			
	%CV (A)	%CV (B)	Δ %CV	Inter %CV	%CV (A)	%CV (B)	Δ %CV	Inter %CV
1	0.4	0.8	0.6	1.1	13.7	32.8	23.2	24.6
2	1.0	0.9	0.9	1.1	53.2	38.5	45.9	40.9
3	0.9	1.0	0.9	0.9	22.7	34.3	28.5	25.8
4	0.5	0.6	0.6	0.7	13.4	33.9	23.7	30.6
5	0.7	1.0	0.8	0.9	8.5	33.5	21.0	31.9
6	0.6	0.7	0.7	0.7	25.7	42.4	34.1	67.0
7	0.7	0.8	0.8	0.8	7.4	46.0	26.7	54.8

TAB. 21 INTRA- UND INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT DER WEIZENSORTE VITUS (PROBE 13)

Signal Nr.	Size [kDa]				Time corrected area			
	%CV (A)	%CV (B)	Δ %CV	Inter %CV	%CV (A)	%CV (B)	Δ %CV	Inter %CV
1	0.9	0.2	0.5	1.2	7.6	9.1	8.3	15.2
2	0.6	2.3	1.5	1.9	31.0	44.7	37.8	59.1
3	0.7	0.6	0.7	1.1	10.1	29.3	19.7	39.8
4	0.5	0.1	0.3	1.3	15.5	68.9	42.2	73.1
5	1.1	0.4	0.8	1.3	35.7	75.8	55.8	69.4
6	0.6	0.5	0.6	1.4	41.3	37.1	39.2	49.0
7	0.5	1.0	0.8	1.2	63.3	61.2	62.2	68.9
8	0.6	0.8	0.7	1.3	65.5	49.1	57.3	67.7

TAB. 22 INTRA- UND INTERCHIPREPRODUZIERBARKEIT DER WEIZENSORTE ALORA (PROBE 30)

Der %CV der Molekülgröße liegt in allen untersuchten Fällen unter den, vom Hersteller angegebenen³⁵ 3 %CV. Die angegebene quantitative Reproduzierbarkeit von 20 %CV (gegeben für „typische Proteine wie z.B. BSA“³⁵) wurde für Weizenproteine jedoch häufig überschritten, in vielen Fällen sogar um ein vielfaches. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Methode gut zur qualitativen Erkennung von Weizensorten geeignet ist. Für quantitative Aussagen muss jedoch große Vorsicht gelten.

4.4.2. BEOBACHTUNGEN BEI METHODE A

Bei der intensiven Beschäftigung mit der CGE-am-Chip, Methode A wurden einige Beobachtungen gemacht, Hürden entdeckt und Abweichungen zu den Angaben festgestellt, die an dieser Stelle Erwähnung finden sollen.

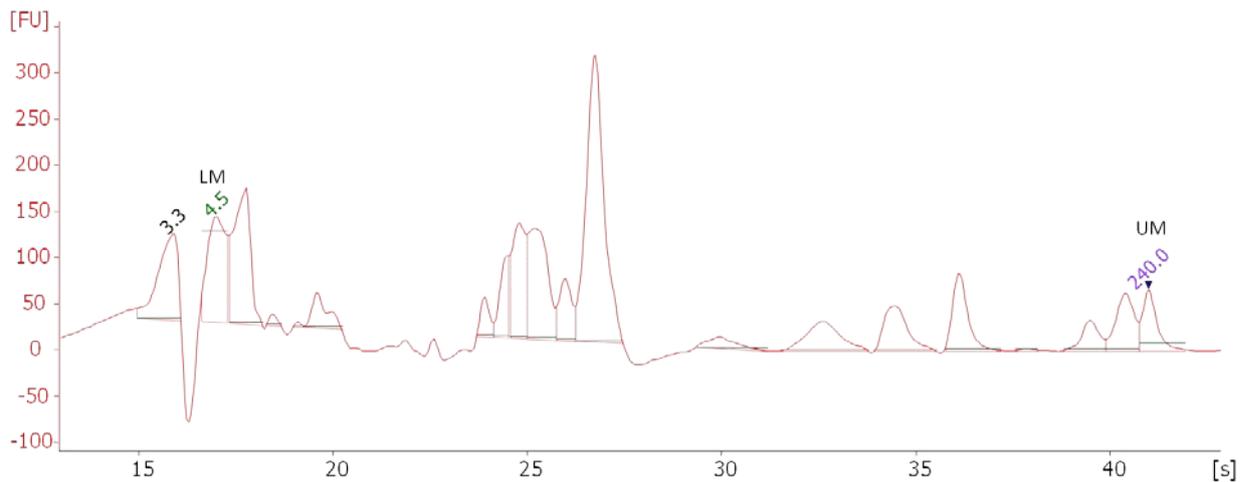


ABB. 24 FALSCHES ZUORDNUNG DES LM (VITUS, PROBE 13, 27.10.2009)

Wie in Abb. 24 gezeigt, kommt es manchmal zu einer falschen Zuordnung des LMs und/oder UMs. Anhand dieser Marker kalibriert die Gerätesoftware die Migrationszeit der Messsignale („zeitkorrigierte“ Werte), womit es zu einer falschen Zuordnung von Migrationszeit und Molekulargewicht kommt. Eine optische Kontrolle durch eine Person zur richtigen Zuordnung der Marker ist unumgänglich.

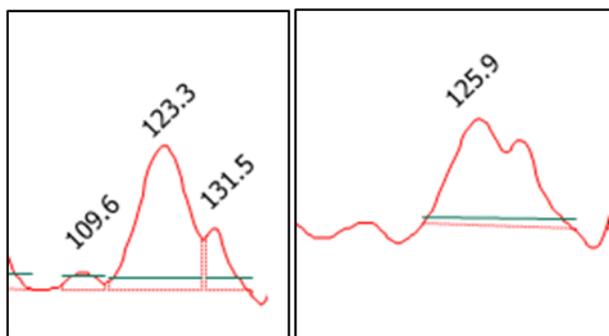


ABB. 25 AUTOMATISCHE INTEGRATION FÜHRT NICHT IMMER ZUM GLEICHEN ERGEBNIS (CAPO, PROBE 2, 27.10 UND 22. 10. 2009)

Ein weiteres Problem stellt die Uneinheitlichkeit der automatische Integration dar. Abb. 25 zeigt zweimal dasselbe Messsignal derselben Probe, das an unterschiedlichen Tagen vermessen wurde. Die automatische Integration wurde mit denselben Integrationsparametern (Standardeinstellungen in 2100 Expert) durchgeführt. Im linken Bildausschnitt, der Messung

vom 27. Oktober 2009, wurden drei Signale erkannt und integriert. Im rechten Bildausschnitt wurde hingegen nur ein Signal erkannt – das linke Signal war zu klein, um integriert zu werden, und die rechten zwei Signale wurden als ein einziges Signal aufgefasst. Dies führt einerseits zu stark unterschiedlichen Signalintensitäten und andererseits zu unterschiedlich langen Signallisten – beispielsweise entspricht das 14. Signal der Messung der Weizensorte Capo vom 27. Oktober (bei ca. 33 s) dem 13. Signal der Messung der gleichen Sorte am 22. Oktober.

Im Folgenden soll auf spezielle Beobachtung bei der Messung von Weizenproteinen eingegangen werden. Wie in Abb. 26 dargestellt, kann es zur Überlagerungen von Messsignalen mit dem UM kommen. Dabei können beide Signale entweder genau zusammenfallen (rot), oder einen Doppelpeak ergeben, der je nach Abstand der Maxima und der Kurvenform von der Auswertungssoftware als entweder ein oder zwei Signale erkannt werden können. Außerdem kann vom Doppelpeak entweder das linke (grün) oder das rechte Signal (blau) als UM interpretiert werden, was zu einer nicht unwesentlichen Abweichung der Migrationszeiten der benachbarten Signale führt.

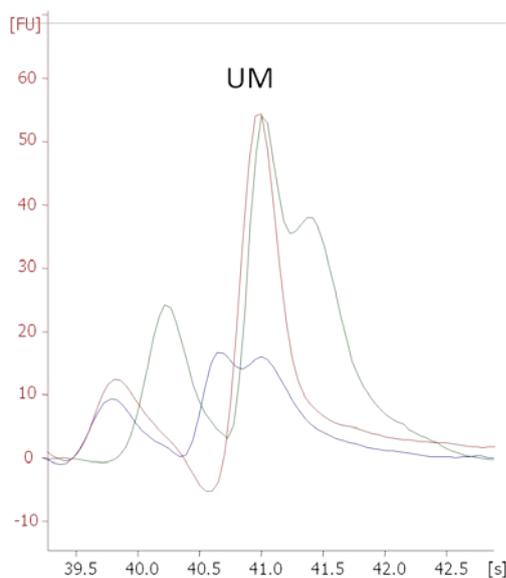


ABB. 26 INTERFERENZ DES UM MIT MESSSIGNALEN (MULAN, PROBE 29, 19.11., 6.10. UND 21.10. 2010)

Abweichend von den Angaben im Protein Kit Guide sind die Proben nach dem letzten Probenvorbereitungsschritt – dem Verdünnen mit 84 μ L UHQ – nicht 12 Stunden haltbar, sondern können schon nach 5 Stunden Lagerzeit nicht mehr reproduzierbar vermessen werden. Abb. 27 zeigt ein Elektropherogramm einer Weizenprobe nach fünfstündiger Lagerung nach Probenvorbereitung. Im Bereich, in dem die Signale der Gluteninuntereinheiten vermutet werden, können nur negative Signale gemessen werden.

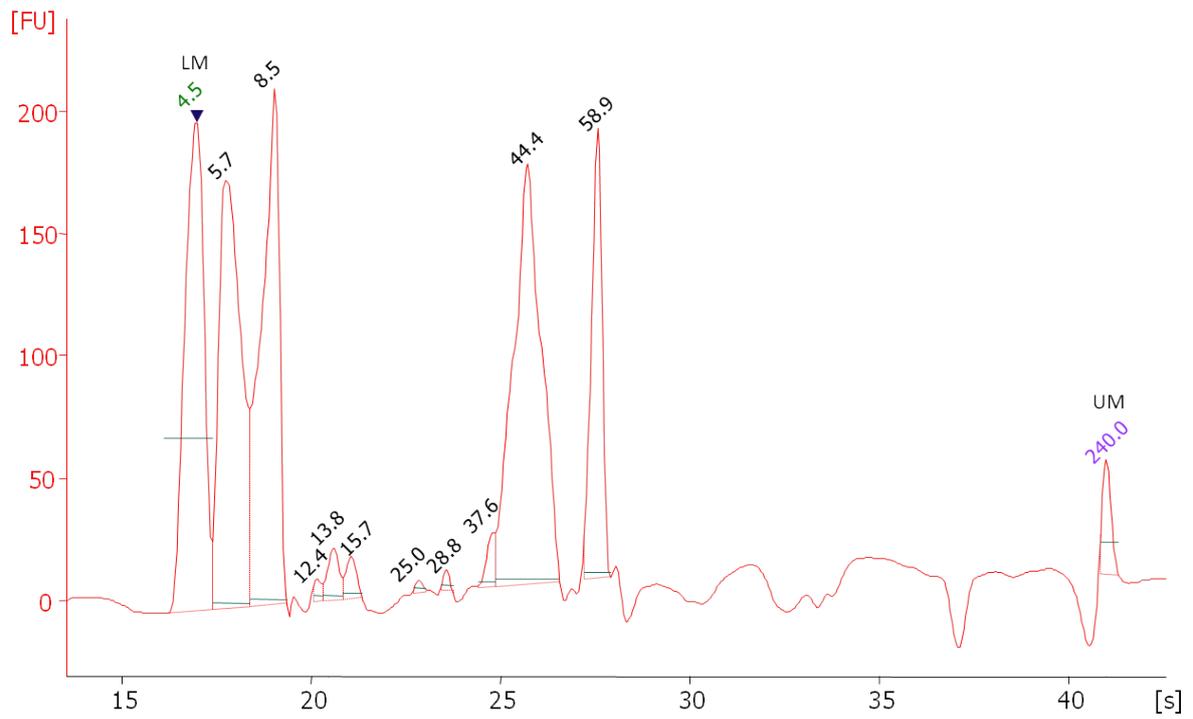


ABB. 27 ELEKTROPHEROGRAMM EINER WEIZENPROBE, PRÄPARIERT GEMÄß METHODE A NACH FÜNFSTÜNDIGER LAGERUNG (FIEDELIUS, PROBE 38)

4.5. VERGLEICH DER ELEKTROPHORESE VON WEIZENGLUTENINEN MITTELS SDS-PAGE UND CGE-AM-CHIP

4.5.1. VERGLEICH DER MIGRATIONSREIHENFOLGE VON SDS-PAGE UND CGE-AM-CHIP

Für die Zählung der Banden der Gluteninuntereinheiten von Weizen auf SDS-PAGE hat sich ein System gemäß Payne et al.⁹ durchgesetzt, das der schwersten Untereinheit die Nummer 1 zuweist. Die Gluteninuntereinheiten der ausgegebenen Proben für diese Untersuchung sind in Tab. 5 angegeben. In den in dieser Arbeit untersuchten Proben (Tab. 5) treten im Gesamten folgende Untereinheiten auf: Nr. 1, 2, 2*, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17 und 18.

Im Vergleich zum SDS-PAGE migrieren bei der CGE-am-Chip die Gluteninuntereinheiten in einer anderen Reihenfolge, so dass beispielsweise Bande Nr. 2 oder 5 rascher als Bande Nr. 1, der „schwersten“ HMW-GUE, migriert. Dieses Phänomen wurde schon bei nicht-miniaturisierter CGE von Weizengluteningenen beobachtet,^{36, 37, 38, 39} wobei für unterschiedliche Trennsystemen durchaus unterschiedliche Migrationsreihenfolgen vorgeschlagen wurden.

In Abb. 29 sind SDS-PAGE und CGE-am-Chip von der Weizensorte Capo einander gegenübergestellt, wobei die SDS-PAGE einen Ausschnitt eines Gels zeigt, auf dem drei Mal der Extrakt des selben Weizenkorns nebeneinander aufgetragen wurde. Die CGE-am-Chip wurden jedoch an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Bei den zwei linken Bahnen der CGE handelt es sich um Aliquote desselben Extraktes eines Weizenkorns, die rechte Bahn zeigt die Elektrophorese eines anderen Weizenkorns, das mit der zweistufigen Extraktionsmethode gemäß 3.5.1.2 extrahiert wurde.

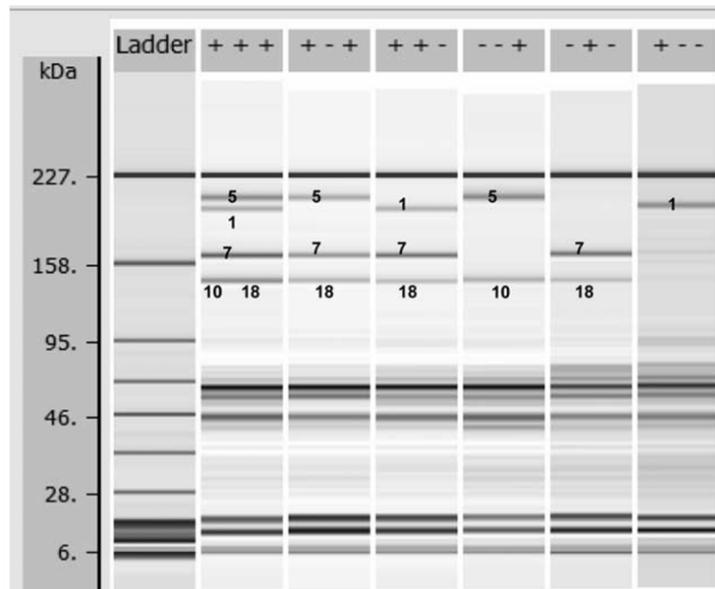


ABB. 28 FIGURE 4 AUS JOURNAL OF CEREAL SCIENCE 44 (2006) 34-39 VGL. BILDNACHWEIS

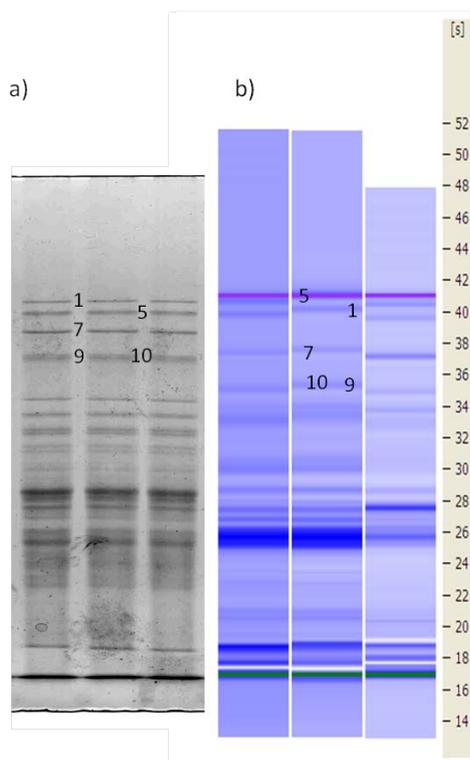


ABB. 29 (A): SDS-PAGE VON CAPO, 29.12.2009, (B): SIMULIERTES GELBILD DREIER UNTERSCHIEDLICHER MESSUNGEN VON CAPO, PROBE 2, V.L.N.R.: 27.10.2009, 22.10.2009, 25.03.2010 – ZWEISTUFIGE EXTRAKTION VGL. 3.5.1.2

In Abb. 29 (A) sind die Banden entsprechend Payne et al⁹ gekennzeichnet. Die Zuordnung der Banden zu HMW-GUE in Abb 28 (B) sei als Hypothese dieser Arbeit verstanden, die sich aus den statistische Untersuchungen (4.7) ergeben und von Befunden aus der Literatur (Abb. 28) gestützt werden. Eine Umkehrung der Migrationsreihenfolge der Banden 1 und 5 bzw. 9 und 10 ist zu beobachten. In Abb. 28 ist ein simuliertes Gelbild des Bioanalyzers 2100 aus Uthayakumaran et al.²⁶ von Weizensorten dargestellt, denen Gluteninuntereinheiten (Locus Glu-

A1, Glu-B1 oder Glu-D1) fehlen. An Hand dieser vereinfachten Elektropherogramme kann die Zuordnung der Gluteninuntereinheiten zweifelsfrei durchgeführt werden. So kann etwa durch Vergleich einer Sorte, die nur das A-Genom enthält (HMW-GUE 1) eindeutig gezeigt werden, dass die HMW-GUE 1 weiter als die HMW-GUE 5 migriert.

4.5.2. VERGLEICH DER GRÖßENZUWEISUNG VON WEIZENGLUTENINBANDEN MITTELS SDS-PAGE UND CGE-AM-CHIP

Die planare Gelelektrophorese wie auch die CGE-am-Chip werden als Methoden der Molekulargewichtsbestimmung gesehen. Hier soll untersucht werden, inwiefern die Aussagen der beiden Methoden über HMW-GUE differieren.

Die Ermittlung der Molekülgröße erfolgt bei der SDS-PAGE wie bei der CGE-am-Chip durch Vergleich der Migrationsstrecke/Migrationszeit mit jener von Markerproteinen bekannter Molekülgröße.

CGE-am-Chip weist den Gluteninuntereinheiten ein wesentlich höheres Molekulargewicht zu als SDS-PAGE. Die schwersten Proteine werden am Chip für ca. doppelt so groß gemessen (240kDa) als am SDS-PAGE (113kDa), die leichtesten Gluteninuntereinheiten werden am Chip jedoch nur ca. 50% größer geschätzt. In Tab. 23 sind die Molekulargewichte der Gluteninuntereinheiten gemäß SDS-PAGE und CGE-am-Chip gegenübergestellt. Bei unterschiedlichen Sorten tritt die 2*-Bande entweder bei ca. 204kDa (Yello) oder 185kDa (Indigo) auf. Die Weizensorte Alora hat ein zusätzliches Signal bei ca. 212kDa (knapp unter dem Bereich der Bande 1).

	SDS-PAGE ⁸	CGE-am-Chip
Banden-Nummer	Masse [kDa]	Masse [kDa]
1	113	214-220
2	108	229-240
2*a	108	203-204
2*b	-	184-185
5	105	223-240
6	100	169-173
7	98	172-183
14	94	123/177-183
15	91	123/177-183
17	90/89,5	121-122/163-169
18	90/89,5	121-122/163-169
8	86	110-122 + 137-140
9	83	117-123
10	83	128-132 + 138-146

12	80	124-123 + 121-123
Alora	-	211-212

TAB. 23 VERGLEICH DER MOLEKULARGEWICHTSZUWEISUNG VON GLUTENINUNTEREINHEITEN MITTELS SDS-PAGE UND CGE-AM-CHIP

4.5.3. EXTRAKTION VON PROTEINBANDEN ZWECKS CHARAKTERISIERUNG

Um einzelne Proteinbanden am SDS-PAGE zweifelsfrei bestimmten Migrationszeiten auf dem CGE-Chip zuordnen zu können, wurde mittels unterschiedlicher Methoden versucht, Proteinbanden aus SDS-PAGE-Gelen zu extrahieren. Alternativ zur Vermessung der Proteinextrakte am CGE-Chip wurden Extrakte auch am MALDI-TOF-MS und SDS-PAGE mit Silberfärbung vermessen.

Zur Nomenklatur der Gelbanden (ein Buchstabe und eine Zahl) siehe Kapitel 4.5.4.1

4.5.3.1. VERSCHIEDENE EXTRAKTIONSMITTEL (CHIP, MALDI)

Die Extraktion erfolgte, so nicht anders angegeben (Elektroelution, Elektrobplot), durch Zugabe von Lösungsmittel zu einzelnen, ausgeschnittenen Gelbanden in Mikrozentrifugenröhrchen. Im Folgenden sollen Beispiele für alle verwendeten Lösungsmittel aufgezeigt werden. Die Ergebnisse zu den Extraktionen aus EDA-haltigen Gelen werden im Kapitel 4.5.4.3 besprochen.

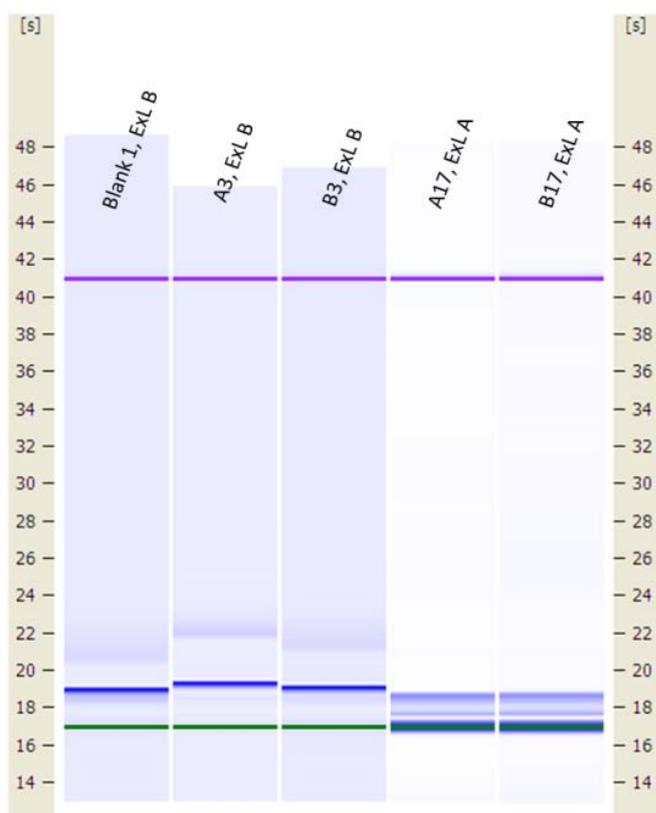


ABB. 30 EXTRAKTE VON PROTEINBANDEN VON SDS-PAGE GEL, METHODE LÄMMLI, EINEN TAG EXTRAHIERT BEI 4°C, ANSCHLIEßEND 3 H BEI 37°C, ULTRASCHALLBEHANDELT. EXTRAKTE VON GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG (EXL) A WURDEN AN DER VAKUUMZENTRIFUGE ZUR TROCKENEN ROTIERT UND MIT UHQ SOLUBILISIERT.

In Abb. 30 sind die ersten Extraktionsversuche dargestellt. Komponenten in Gelbanden-Extraktionslösung A stören bei der Messung am Bioanalyzer (organische Komponenten, pH-Wert), weshalb die Gelbanden-Extraktionslösung vor der Messung mittels Vakuumzentrifuge schonend entfernt wurde. Vorab wurden die ausgeschnittenen Gelbanden entfärbt, wie in Stübiger et al.⁴⁰ Wie in der Abb. ersichtlich, konnten keine Gluteninextrakte dedektiert werden.

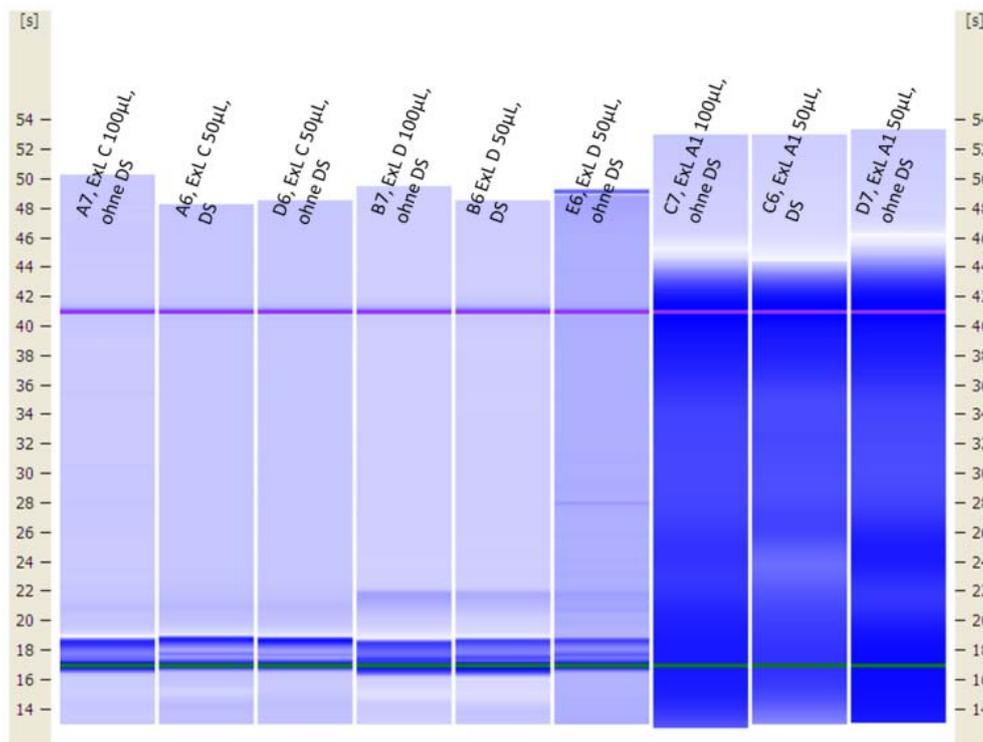


ABB. 31 EXTRAKTE VON PROTEINBANDEN VON SDS-PAGE GEL, METHODE LÄMMLI, DREI TAGE EXTRAHIERT BEI 4°C, ULTRASCHALLBEHANDELT, MIT UND OHNE VORHERIGEM ENTFÄRBN (DS). EXTRAKTE VON GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG (EXL) A1 WURDEN AN DER VAKUUMZENTRIFUGE ZUR TROCKENEN ROTIERT UND MIT UHQ SOLUBILISIERT.

Gemäß Jorgensen et al.⁴¹ ist die Proteinextraktion aus SDS-PAGE-Gelen unter Verwendung eines Detergenzes wie SDS wesentlich effizienter. Deshalb wurden für weitere Extraktionsversuche LDS-haltige Extraktionslösungen verwendet. LDS ist etwas besser kompatibel mit MALDI-TOF-MS als SDS⁴².

In Abb. 31 sind Bioanalyzermessungen von Proteinextraktionen mit, mit LDS versetzter, Extraktionslösung A und zwei weiteren Extraktionslösungen (Inhaltsstoffe vgl. 3.3.4.1) dargestellt.⁴¹ Jeweils 4 µL eines Extraktes wurden direkt der Chipprobenvorbereitung unterworfen. Die Entfernung der, die Bioanalyzermessung störenden Extraktionsmittelkomponenten war nicht vollständig.

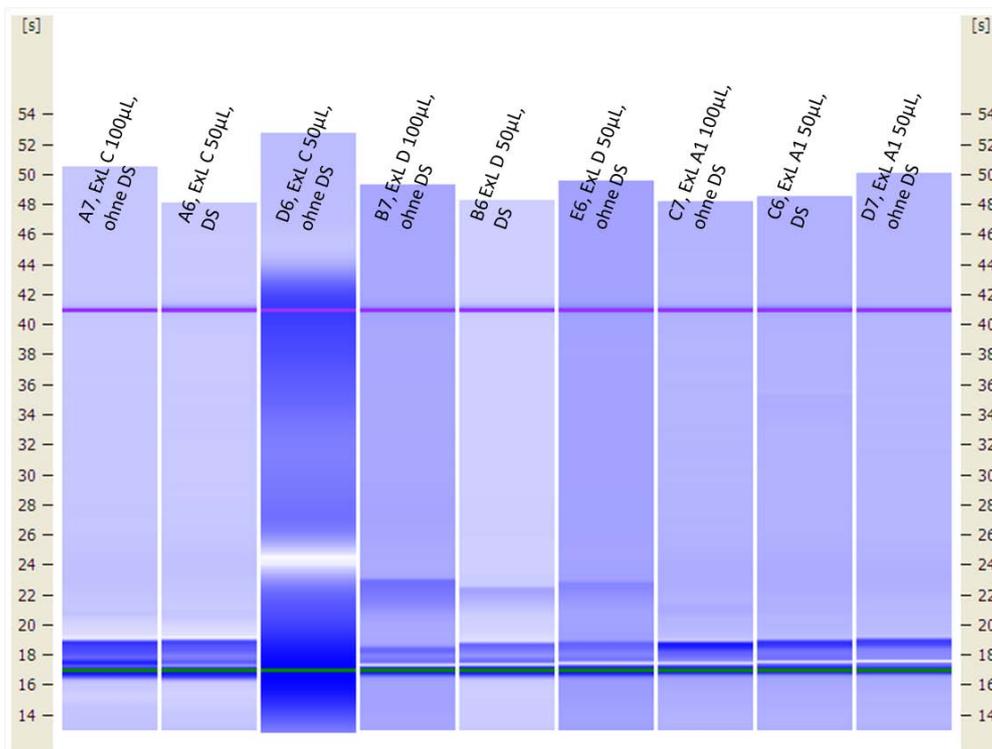


ABB. 32 EXTRAKTE VON PROTEINBANDEN VON SDS-PAGE GEL, METHODE LÄMMLI, DREI TAGE EXTRAHIERT BEI 4°C, ULTRASCHALLBEHANDELT, MIT UND OHNE VORHERIGEM ENTFÄRBN (DS). ALLE EXTRAKTE WURDEN ZWECKS KONZENTRATIONSSTEIGERUNG AN DER VAKUUMZENTRIFUGE ZUR TROCKENEN ROTIERT UND IN UHQ SOLUBILISIERT. EXL...GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG

Abb. 32 zeigt eine Messung derselben Extrakte, zur Aufkonzentrierung wurde jedoch die gesamte verbleibende Gelbanden-Extraktionslösung in der Vakuumzentrifuge abgezogen und mit 10 µL UHQ resolubilisiert. Die störenden Komponenten von Gelbanden-Extraktionslösung A1 konnten hier ausreichend entfernt werden.

In Bahn 6 der Abb. 31 sind Banden erkennbar – Diese Bahn ist als Elektropherogramm in Abb. 33 nochmal dargestellt. Die Signale liegen bei 62,8 und 98,6 kDa. Da es sich bei der zu extrahierenden SDS-PAGE-Bande E6 vermutlich um eine LMW-GU handelt, könnten die Elektropherogrammsignale bei den oben genannten kDa tatsächlich von extrahiertem Protein stammen.

Gelbanden-Extraktionslösung D wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

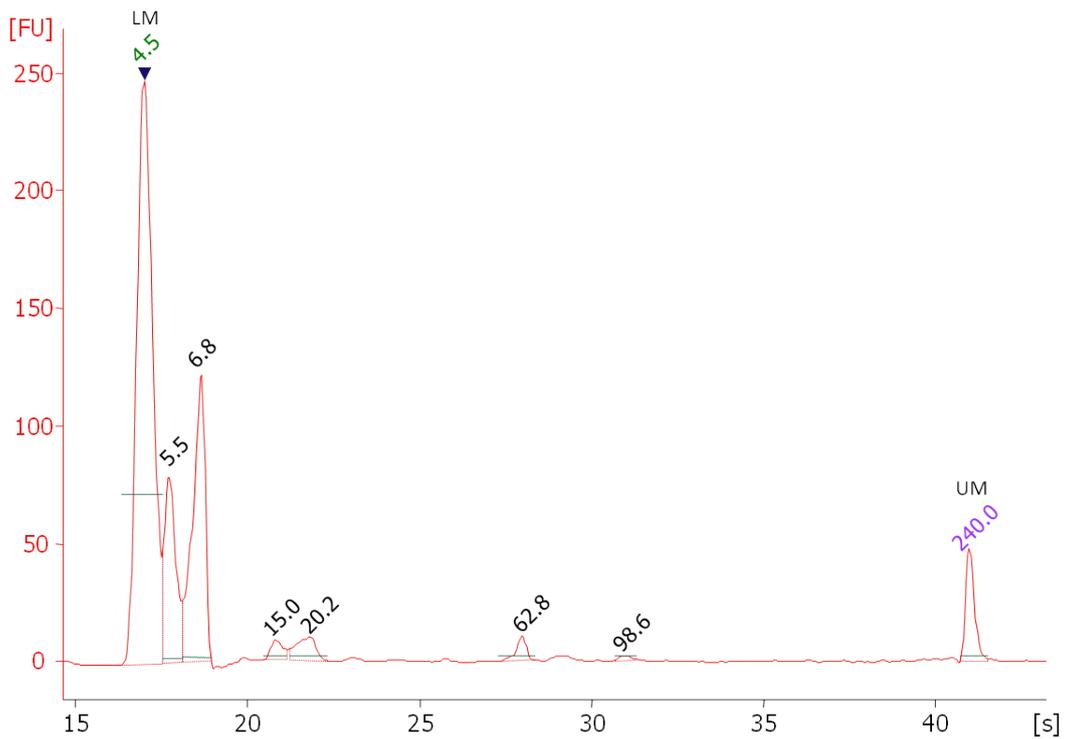


ABB. 33 ELEKTROPHEROGRAMM DES EXTRAKTES DER PROTEINBANDE E6, GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG D OHNE DS. ENTSPRICHT BAHN 6 IN ABB. 31

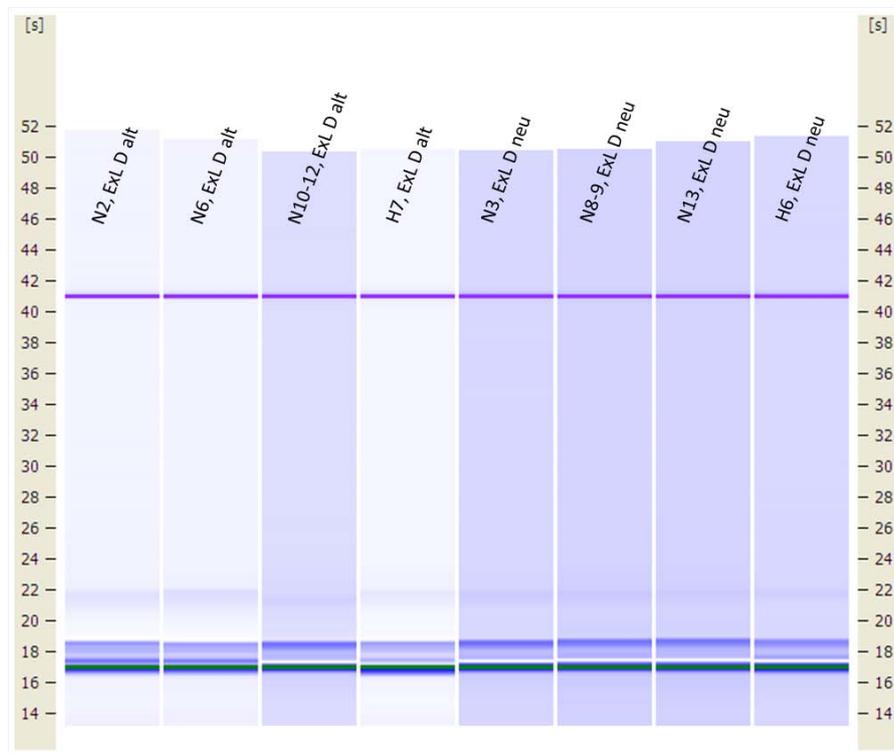


ABB. 34 EXTRAKTE VON PROTEINBANDEN VON SDS-PAGE GEL, METHODE LÄMMLI, DREI TAGE EXTRAHIERT BEI 4°C, ULTRASCHALLBEHANDELT. GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG (EXL) D ALT IST JENE, DIE FÜR MESSUNGEN IN ABB. 31, ABB. 32 UND ABB. 33 VERWENDET WURDE, (4 TAGE ALT), EXL D NEU WURDE FRISCH BEREITET.

In den Abb. 34 und Abb. 35 sind Messergebnissen von weiteren Extraktionen mit Gelbanden-Extraktionslösung D dargestellt. Sowohl HMW-GUE- als auch LMW-GUE-Banden wurden zur Extraktion herangezogen, 4 µL der Extrakte direkt vermessen (Abb. 34) als auch eine Aufkonzentration durchgeführt (Abb. 35)

In beiden Messungen sind keine Banden zu erkennen, das Ergebnis von Abb. 33 war also nicht reproduzierbar.

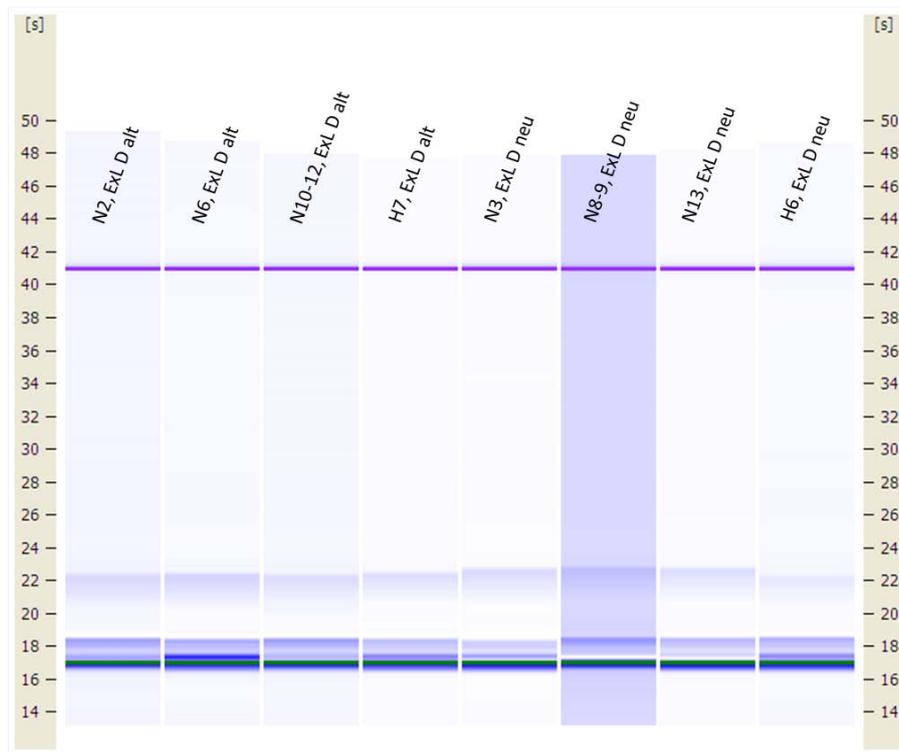


ABB. 35 EXTRAKTE VON PROTEINBANDEN VON SDS-PAGE GEL, METHODE LÄMMLI, DREI TAGE EXTRAHIERT BEI 4°C, ULTRASCHALLBEHANDELT. GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG (EXL D) ALT IST JENE, DIE FÜR MESSUNGEN IN ABB. 31, ABB. 32 UND ABB. 33 VERWENDET WURDE, (4 TAGE ALT), EXL D NEU WURDE FRISCH BEREITET. ALLE EXTRAKTE WURDEN ZWECKS KONZENTRATIONSSTEIGERUNG AN DER VAKUUMZENTRIFUGE ZUR TROCKENEN ROTIERT UND MIT UHQ RESOLUBILISIERT.

Es ist nicht gelungen, aus SDS-PAGE-Banden der Gluteninuntereinheiten ausreichend Protein zu extrahieren, sodass mittels CGE-am-Chip ein entsprechendes Signal gemessen werden konnten.

4.5.3.2. ELEKTROELUTION

Bei der Elektroelution sollen Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus einer ausgeschnittenen Gelbande, die sich in einem puffergefüllte E-Röhrchen befindet, in die Lösung wandern und dann von der Membran des E-Röhrchens zurückgehalten werden.

In Abb. 36 sind Messergebnisse zweier Elektroelutionen dargestellt. Aus jedem der zwei E-röhrchen wurden nach 4 h und 5 h Elution 4 µL zwecks Messung entnommen, sowie die Eluate in der Vakuumpzentrifuge auf ca. 40% ihres Volumens eingeeengt. Es konnten keine Proteine detektiert werden.

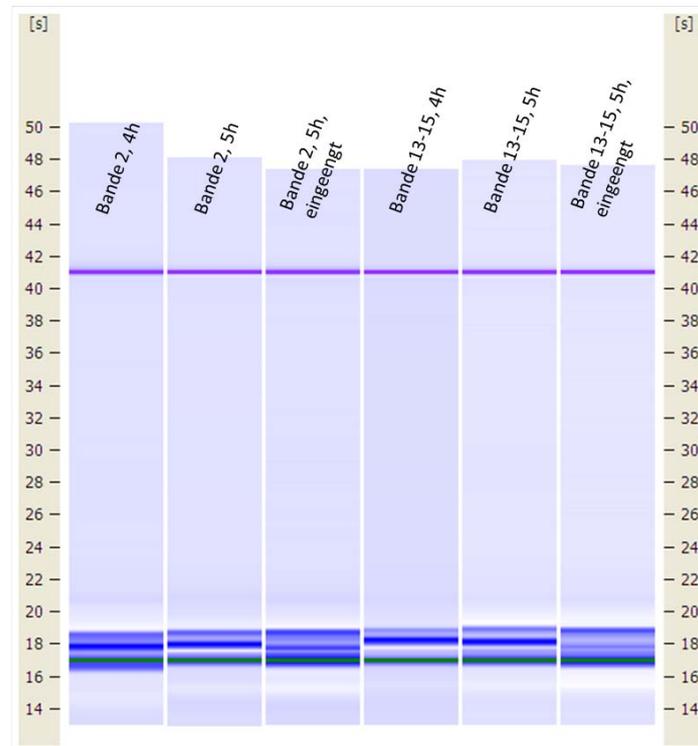


ABB. 36 ELEKTROELUTION DER VEREINIGTEN CAPO-BANDEN B2, E2 UND F2 (ENTSPRICHT HMW-GUE 5 GEMÄß⁹⁾) BZW. G13-15 (LMW-GUES ODER GLIADINE), 4 BZW. 5 H ELUIERT BEI 150 V

Es ist nicht gelungen, mittels Elektroelution der Gluteninuntereinheiten ausreichend Protein zu extrahieren, um es mittels CGE-am-Chip messen zu können.

4.5.3.3. ELEKTROBLOTTEN

Auch beim Elektrobloppen sollen die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel (oder Gelstück) wandern und von einer, direkt unter dem Gel liegenden Membran festgehalten werden. Die proteintragenden Membranstücke werden ausgeschnitten und entweder gelöst oder die Proteine extrahiert.

In Abb. 37 ist die Vermessung von Extraktionen bzw. Lösungen von NZ-Membranstücken dargestellt. Gebloppet wurden ausgeschnittene, entfärbte Gelbanden eines SDS-PAGE-Gels mit 7% T. Sowohl HMW-GUE als auch leichtere Banden wurden ausgewählt und eine der

dargestellten Banden vor der Zugabe von Lösungsmittel mit Ponceau S gefärbt. Bei keiner der unterschiedlichen Proteinbanden bzw. Lösungs-/Extraktionsmittel ist Protein messbar.

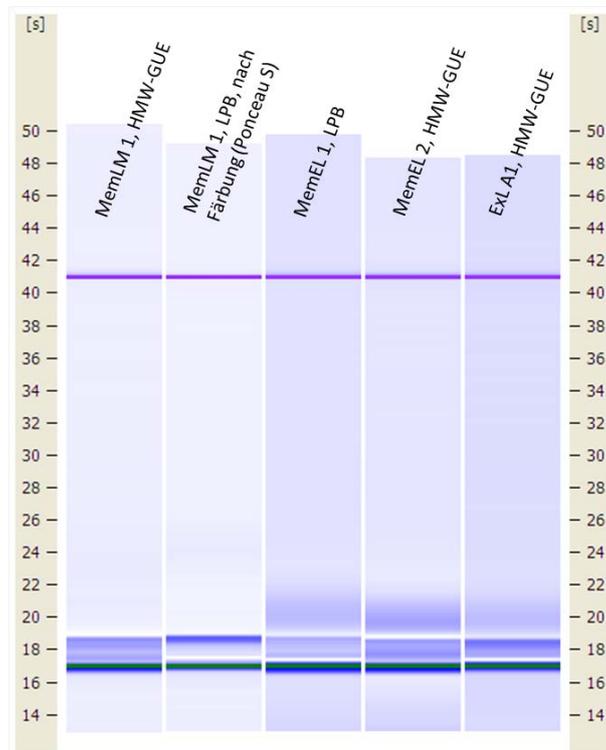


ABB. 37 LÖSUNG VON NZ-MEMBRANSTÜCKEN (BAHN 1 + 2) BZW. EXTRAKTION VON NC-MEMBRANSTÜCKEN (BAHN 3-5) (1 TAG, 42°C) NACH ELEKTROBLOT (1 H; 0,8 A / CM²) VON GELSTÜCKEN EINES 7% T SDS-PAGE-GELS; MEMLM...MEMBRAN-LÖSUNGSMITTEL; MEMEL...MEMBRAN-EXTRAKTIONS-LÖSUNG, LPB...LEICHTE PROTEINBANDE

Es ist nicht gelungen, aus NZ-Blotten von SDS-PAGE-Banden der Gluteninuntereinheiten ausreichend Protein zu extrahieren, als das es mittels CGE-am-Chip messbar wäre.

4.5.4. VERGLEICH PAGE-METHODEN BEZÜGLICH EXTRAHIERBARKEIT VON PROTEINEN

4.5.4.1. SDS-PAGE, UPOV

Für die Extraktionsuntersuchungen (4.5.3) wurde zwei SDS-PAGE Trennungen gemäß der UPOV-Methode (3.6.1) durchgeführt. Bei beiden Gelen wurde statt des Fixierens nur mit Wasser gewaschen (3.6.1.4). Eines der Gele wurde mit gewöhnlicher CBB-Färbelösung (UPOV) und das andere mit CBB-Färbelösung, ohne Säuren und Alkohol gefärbt (3.2). Dies wurde so durchgeführt, da das Elektroelutionsprotokoll²⁸ angibt, dass die Behandlung des Gels mit Alkohol und Säure die Elutionsausbeute stark herabsetzt.

Extrakte dreier Weizenkörner der Sorte Capo wurden jeweils fünf Mal aufgetragen. Es stellte sich heraus, dass es sich beim dritten Weizenkorn um eine seltene genetische Variation von Capo handelt, bei der z.B. Bande 1 fehlt (Abb. 38). Während die Färbung mit CBB-Färbelösung (UPOV) gut funktionierte, war die Färbung mit CBB-Färbelösung, ohne Säuren und Alkohol nur unvollständig, sodass nur wenige Banden ausgeschnitten werden konnten.

In Abb. 38 ist das unfixierte SDS-PAGE-Gel nach konventioneller Färbung (CBB-Lösung mit Säure und Essig versetzt) zu sehen, nachdem die Proteinbanden ausgeschnitten wurden. Auf den Bahnen A-E und F-J ist jeweils ein Weizenkornextrakt aufgetragen, das das übliche Bandenmuster für Capo zeigt, und auf den Bahnen K-O der Extrakt des dritten Weizenkorns, mit dem außergewöhnlichen Bandenmuster. In Tab. 24 sind die ausgeschnittenen Banden noch einmal übersichtlicher zusammengestellt. Die Banden wurden bis zu ihrer Vermessung bei -20°C gelagert.

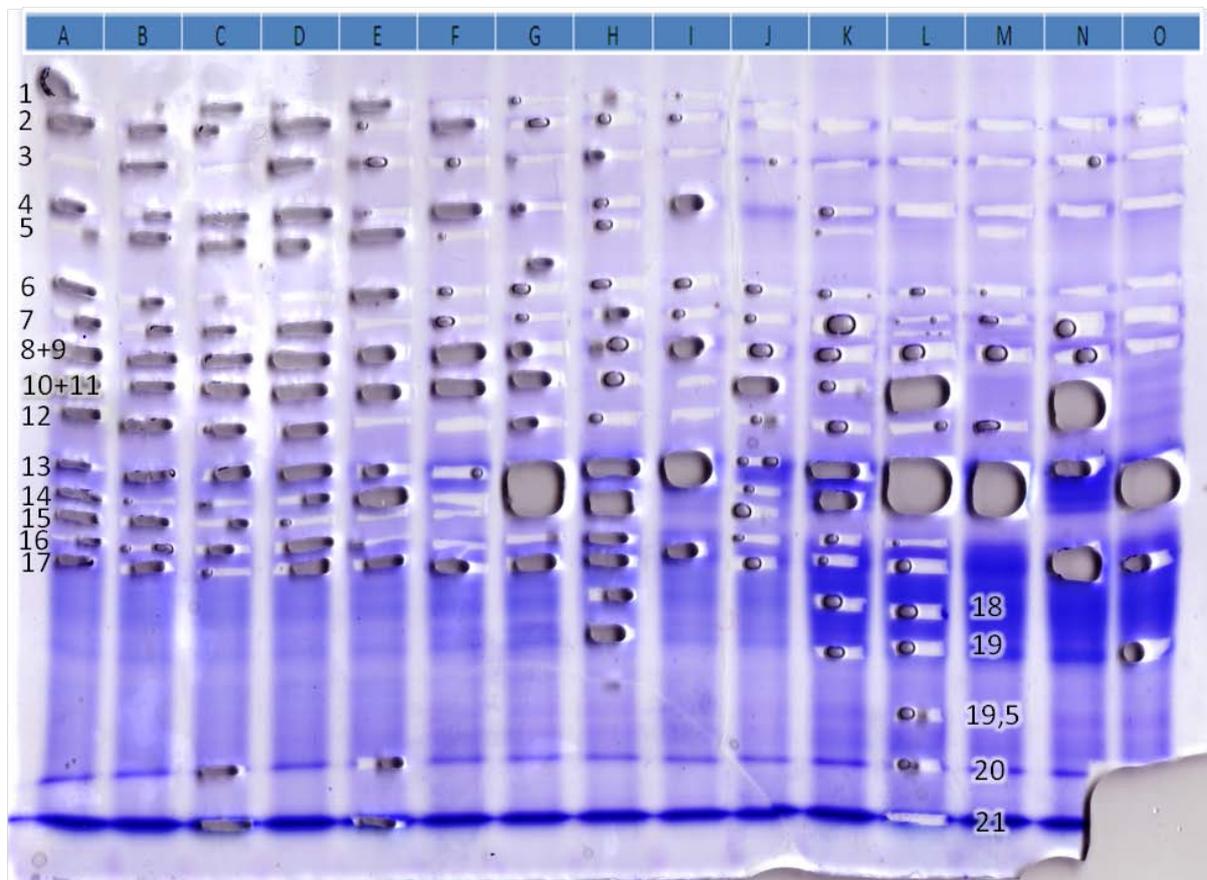


ABB. 38 SDS-PAGE-GEL, UPOV-METHODE 10% T, OHNE FIXIEREN. GELBANDEN WURDEN AUSGESCHNITTEN UND BEI -20°C GELAGERT. LINKS IST DIE NUMMERIERUNG DER GELBANDEN DARGESTELLT, WIE SIE AUCH IN TAB. 24 UND IM GESAMTEN KAPITEL 4.5.3 VERWENDUNG FINDET.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		0			
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

4	4	4	4	4	4	4	4	4		4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5b	5				4,5	5		
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7+7b	7+7b
										7b	7b			
8+9	8+9	8+9	8+9	8	8	8	8	8+9	8	8	8	8	8+9	8+9
				9	9	9	9		9	9	9			
10+11	10+11	10+11	10+11	10	10	10	10	10+11	10	10	10		10-12	
				11	11	11	11		11	11	11			
											11,5			
12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12		
13	13	13	13	13	13	13-15	13	13-14	13	13	13	13-13,5	13	13-15
											13,5			
14	14	14	14	14	14		14		14,5	14-15	14	14-15		
15	15	15	15	15	15		15		15,5		15			
16	16	16	16	16	16	16	16		16	16	16		16-17	
17	17	17	17	17	17	17	17	17?	17	17	17			17
							18			18	18			
							19			19	19			19
											19,5			
		20		20							20			
		21		21							21			

TAB. 24 AUSGESCHNITTENE PROTEINBANDEN AUS SDS-PAGE-GEL IN ABB. 38

In Tab. 25 sind die Bandenbezeichnung in dieser Arbeit der Nomenklatur der Gluteninuntereinheiten gegenübergestellt. Nur bei den ersten vier Banden handelt es sich um Gluteninuntereinheiten, vgl. dazu auch Abb. 29 (A). Es wurden jedoch auch Banden von leichteren Proteinen den Extraktionsexperimenten zugeführt, da auch deren Migrationszeit bei der CGE-am-Chip untersucht werden sollte, um beispielsweise Interferenzen auszuschließen.

Bandennr.	HMW-GUE
1	1
2	5
3	7
4	9 + 10

TAB. 25 GEGENÜBERSTELLUNG DER BANDENBEZEICHNUNG IN ABB. 38
UND TAB. 24 MIT DER GÄNGIGEN NOMENKLATUR DER GLUTENINUNTEREINHEITEN⁹

Aus dem zweiten SDS-PAGE-Gel mit 10% T, das unter vollständigem Ausschluss von Alkohol und Säure gefärbt wurde, konnten jeweils nur die 1-3 Banden mit dem höchsten Molekulargewicht zweifelsfrei erkannt und ausgeschnitten werden. Extraktions- und Elektroelutionsexperimente dieser Banden, die hier nicht dargestellt sind, waren ebenso wenig erfolgreich wie die Extraktionen alkohol- und säurehaltig gefärbten Banden.

Parallel zu den Gelen mit 10% T wurden auch zwei SDS-PAGEs mit Gelen mit 7% T durchgeführt. Der geringere Anteil an Quervernetzung führt zu einem leicht veränderten Bandenmuster. Die größere Porengröße der Gele sollte zu einer besseren Extrahierbarkeit der Proteine aus

Proteinbanden führen. Mit Gelbanden aus jenem Gel, das mit CBB-Färbelösung (UPOV) gefärbt wurde, wurden das Elektrobloexperiment in Abb. 37 durchgeführt.

4.5.4.2. SDS-PAGE, LÄMMLI

Zur weiteren Untersuchung des Extraktionsverhaltens von Proteinen aus SDS-PAGE-Gelen wurde Ovotransferrin als Modellsubstanz ausgewählt. Mit einem Molekulargewicht von 78 kDa entspricht es in der Größe den leichteren HMW-GUE. Da es, im Unterschied zu Weizen-GUE in Reinform vorhanden ist, kann damit eine Prozedur der Aufreinigung (Abtrennung von LDS bzw. SDS) vor der Messung am Massenspektrometer erstellt werden.

Auf ein, mit Methode Lämmli (3.6.2.1) erstelltes SDS-PAGE-Gel wurde unter Variation der Volumina (10, 5 und 3 μ L) 1%ige (w/v) Ovotransferrinlösung aufgetragen (3.5.3) und eine SDS-PAGE-Elektrophorese durchgeführt (50mA, 100-150V, Laufzeit 1h). Das Gel wurde nicht sofort gefärbt, sondern nach den ersten sechs Bahnen zerteilt. Dieses sechsbahnige Gelstück wurde einem Elektroblo auf NZ unterzogen und erst nach dem Blotten wurde dieses Gel CBB-gefärbt. Ein weiteres drei Banden breites Gelstück wurde direkt mit CBB gefärbt (Abb. 39 (B)). Auf diese Weise konnte verglichen werden, wie viel vom Ovotransferrin nach dem Blotten im Gel verbleibt. Nicht das gesamte Ovotransferrin wurde beim Blotten auf die NZ-Membran übertragen, jedoch ist eine deutliche Intensivitätsverringering der Proteinbanden erkennbar (Abb. 39(A)). Die Blotbedingungen wurden wie folgt gewählt: 24mA (=0,8 mA/cm²), 1h.

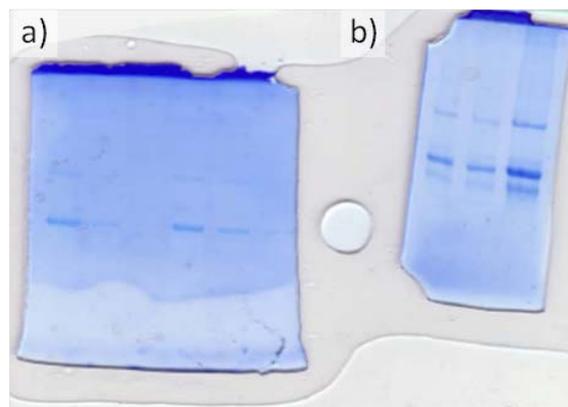


ABB. 39 SDS-PAGE, METHODE LÄMMLI, VON OVOTRANSFERRIN A) GEL NACH BLOTTEN CBB-GEFÄRBT B) GEL DIREKT NACH SDS-PAGE CBB-GEFÄRBT.

Die NZ-Membran wurde nach dem Blotten mit Ponceau S gefärbt, wobei die Proteinbanden nur schwach sichtbar wurden. In Abb. 40 ist eine Skizze der Membran gezeigt. Es waren jeweils zwei Banden deutlich genug sichtbar, um sie am Leuchtschirm mittels Skalpell auszuschneiden und in ein Mikrozentrifugenröhrchen zu überführen. Die NZ-Stückchen der linken drei Bahnen

(Ovotransferrin, jeweils 10, 5 und 3 μL auf das SDS-Gel aufgetragen) wurden mit einer minimalen Menge DMSO, die rechten drei mit Aceton/Isopropanol (1:1, V/V) aufgelöst.

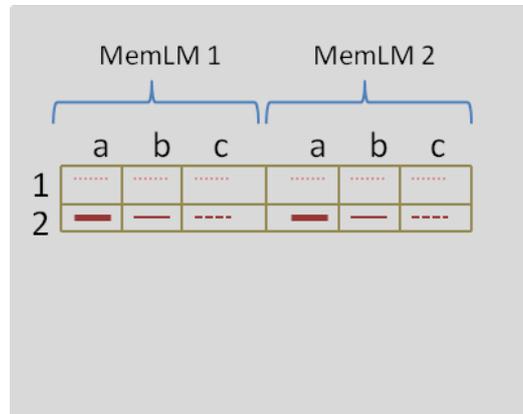


ABB. 40 SKIZZE DER NZ-MEMBRAN NACH FÄRBUNG MIT PONCEAU S NACH DEM ELEKTROBLOT DES SDS-PAGE-GELS IN ABB. 39 A;

AUSGESCHNITTENE MEMBRANTEILE

Jeweils 10 μL der NZ-Lösungen, die Ovotransferrinproteine enthalten, wurden auf ein weiteres SDS-PAGE-Gel, Methode Lämmli aufgetragen. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde die nachweisstärkere Silberfärbung (3.6.2.3) gewählt. Wie in Abb. 41 erkennbar, sind trotz starker Überfärbung keine Ovotransferrinbanden erkennbar. Als Proteinmarker wurden SeeBlue™ und die Ladder des Agilent Protein 230 Assay (3.6.4.1) eingesetzt.

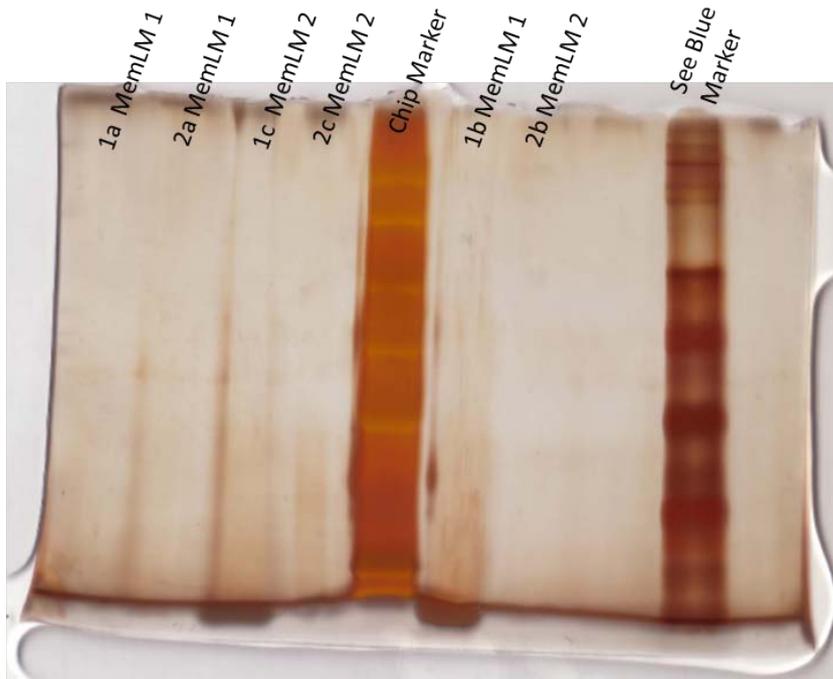


ABB. 41 SDS-PAGE VON NZ-LÖSUNGEN, DIE OVOTRANSFERRINBANDEN ENTHALTEN, SILBERGEFÄRBT. MEMLM...MEMBRAN-LÖSUNGSMITTEL, ZUR NOMENKLATUR VGL. ABB. 40

Zusätzlich wurden die Membranlösungen am MALDI-TOF-MS vermessen (3.7) Eine vorherige Entfernung von SDS via ZipTip Technologie war in diesem Fall nicht nötig. In Abb. 42 sind einige Messergebnisse der MALDI-TOF-MS-Messung dargestellt. Im obersten Massenspektrum ist die direkte Messung einer Ovotransferrinlösung gezeigt, der $[M+H]^+$ und $[M+2H]^{2+}$ -Peak sind zu erkennen. Die nächsten zwei Massenspektren zeigen typische Ergebnisse für die Messung der Proteinbanden-NZ-Membranen – keine Signale sind erkennbar. Das unterste Massenspektrum zeigt die einzige Messung, bei der ein Peak erkennbar war. Die abgeleitete Masse stimmt jedoch nicht mit der Ovotransferrinmasse überein. Da die Messung nicht reproduzierbar war, muss vermutet werden, dass es sich bei diesem Ergebnis um ein Artefakt oder eine Kontamination handelt.

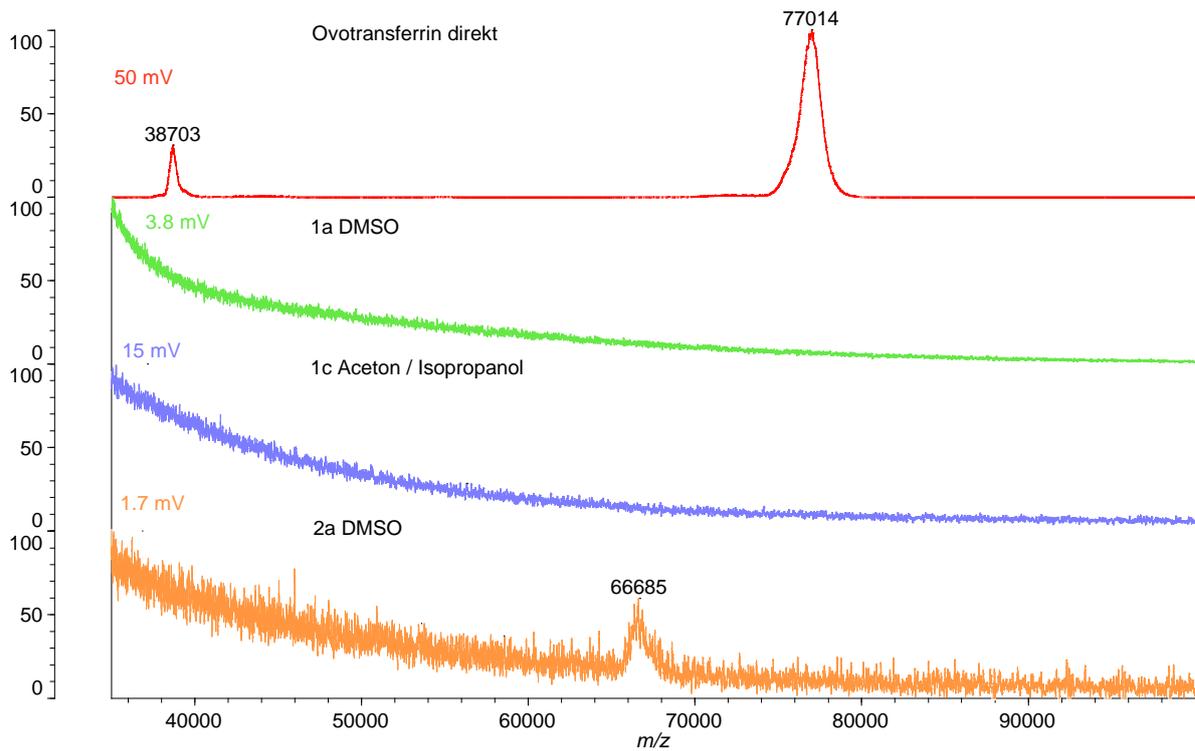
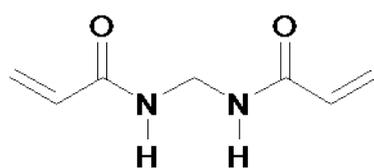


ABB. 42 MALDI-TOF VON OVOTRANSFERRIN (OBERSTES, $[M+H]^+$ UND $[M+2H]^{2+}$) UND VON LÖSUNGEN VON NZ-MEMBRANEN

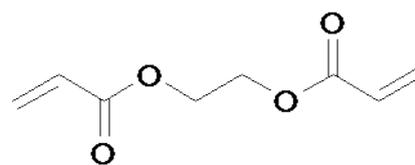
Weitere Extraktionsversuche von Ovotransferrin aus EDA-haltigen Gelen sind im entsprechenden Kapitel 4.5.4.3 besprochen.

4.5.4.3. EDA-HALTIGE SDS-PAGE

Um eine höhere Extraktionsausbeute der Proteine aus SDS-PAGE-Gelen zu erzielen, wurde eine abgewandelte SDS-PAGE-Methode eingesetzt, bei der 50 % der Stoffmenge des Quervernetzers (üblicherweise BisAA) durch EDA ersetzt (Abb. 43)



Bisacrylamid



Ethylen-glycol-diacrylat

ABB. 43 SDS-PAGE QUERVERNETZER

EDA ist, im Unterschied zu BisAA, hydrolytisch spaltbar, wodurch sich eine bessere Extrahierbarkeit von Proteinen ergeben sollte. Weiters wurden, im Unterschied zu SDS-Page (Methode Lämmli) (3.6.2.1), % T um 1,3 Einheiten erhöht, um ein ähnliches Bandenmuster zu erhalten (3.6.2.2).

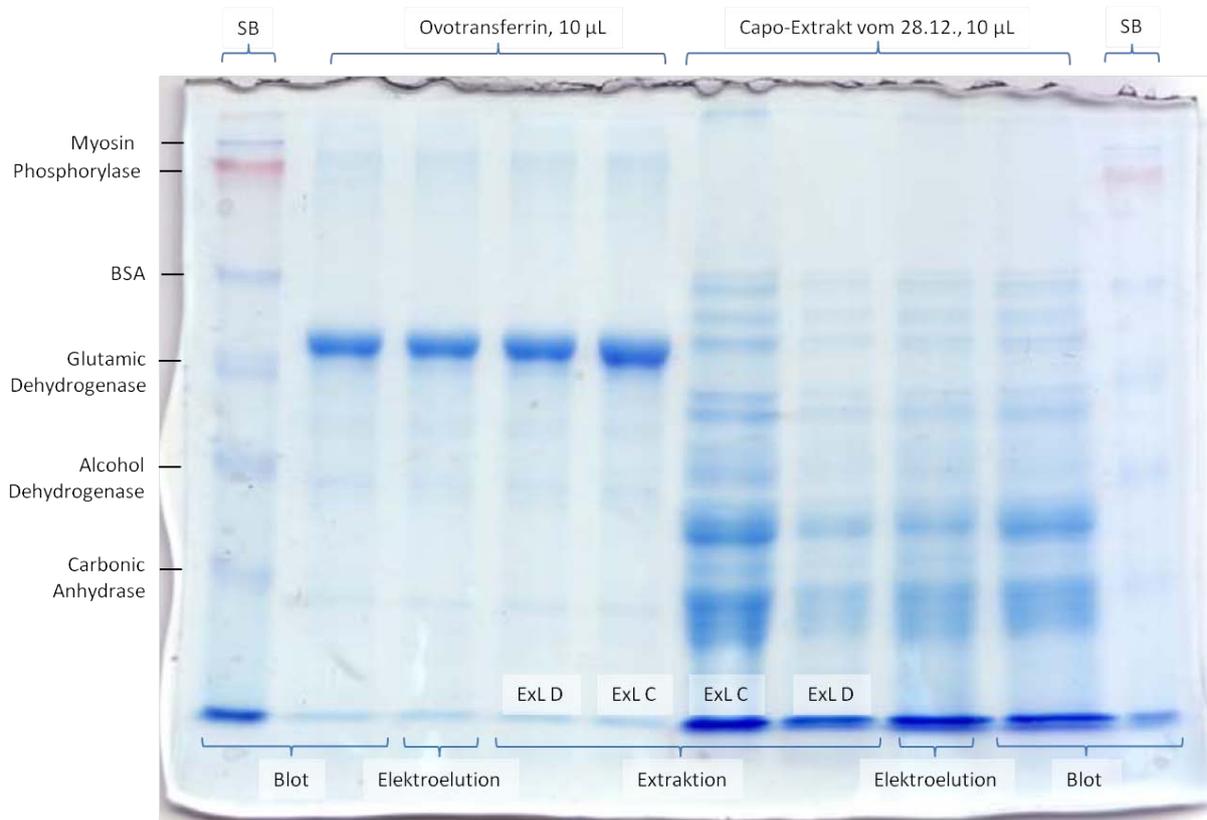


ABB. 44 EDA-HALTIGE SDS-PAGE VON OVOTRANSFERRIN UND WEIZENPROTEINEN; SB...MOLEKULARGEWICHTSMARKER SEEBLUE

In Abb. 44 ist ein CBB-gefärbtes EDA-Gel gezeigt. Je vier Mal ist Ovotransferrin und Weizenextrakt (einstufig) aufgetragen. Der Scan wurde direkt nach dem CBB-Färben, noch vor der hydrolytischen Spaltung des EDA erzeugt. Wie im unteren Bereich der Abbildung dargestellt, wurde je eine Bahn einer Elektroelution, je eine Bahn und den beiden Molekulargewichtsmarkerbahnen einem Elektroblot und je zwei Bahnen einer Schüttel-Extraktion zugeführt.

Für die Schüttel-Extraktion wurden Gelbanden ausgeschnitten, in Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und dann einzeln entfärbt und hydrolytisch gespalten (3.6.2.2). Die Gelbanden von Ovotransferrin und der Weizenproteinproben wurden mit Gelbanden-Extraktionslösung C versetzt, jene der beiden anderen Bahnen mit Gelbanden-Extraktionslösung D.

Extrahiert wurde zwei Tage bei 4°C unter ständigem Schütteln. Die Extrakte wurden mittels CGE-am-Chip (Methode A) vermessen.

Durch die unmittelbare Probenvorbereitung für die Vermessung am Proteinchip kommt es zu einer nicht unwesentlichen Verdünnung des Analyten (4 μL Probe und 2 μL Denaturierungsmix werden mit 84 μL Wasser versetzt). Da bisherige Messungen von Proteinextrakten mittels CGE-am-Chip negativ verlaufen waren, sollte versucht werden, ob eine Abwandlung des Protokolls in Richtung geringere Verdünnung der Analyten zu deren Messbarkeit führt. 4 μL der Probe Capo Gelbanden-Extraktionslösung D, 8 wurden nur mit 0,5 μL Denaturierungsmix versetzt und anschließend nur mit 21 μL ultrahochreinem UHQ versetzt – das entspricht einer vier Mal so hohen Analytkonzentration in der zu vermessenden Lösung. Durch die Vorbehandlung der Probe (Extraktion aus Weizen mit denaturierenden Komponenten, Extraktion aus SDS-PAGE-Gel mit SDS-haltiger Gelbanden-Extraktionslösung) kann angenommen werden, dass auch die geringere Menge an Denaturierungsmix ausreicht, um die Proteine, so vorhanden, in denaturierter Form zu halten.

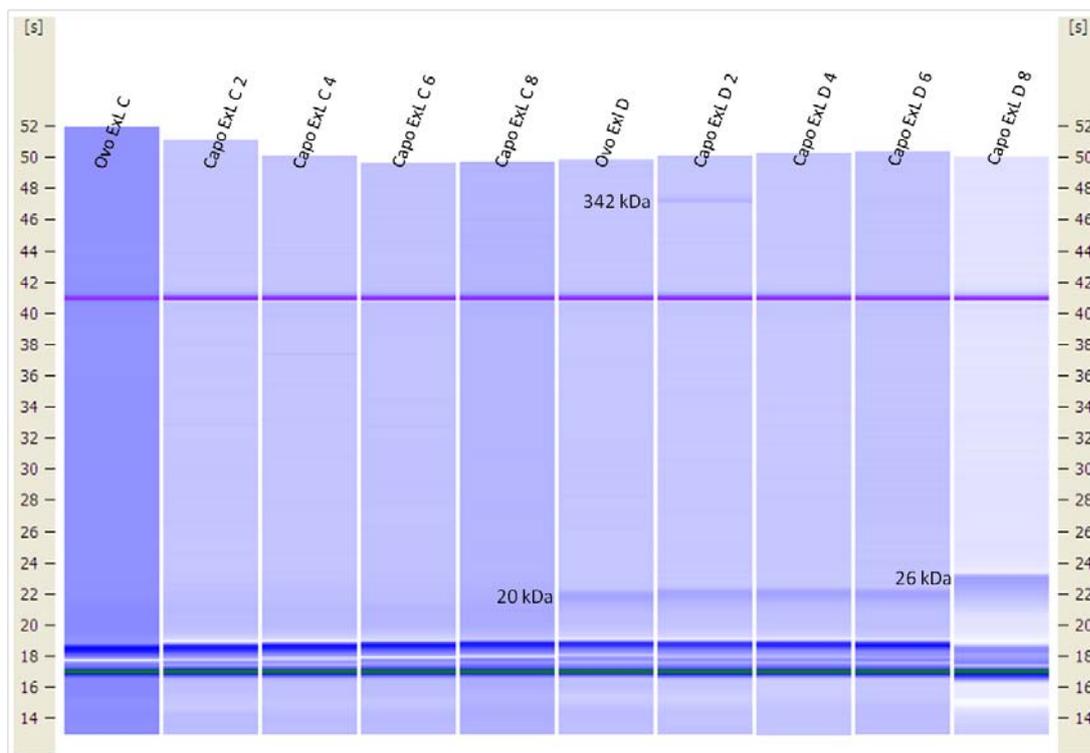


ABB. 45 CGE-AM-CHIP VON EXTRAKTEN AUS EDA-HÄLTIGEM SDS-PAGE-GEL; EXL...GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG

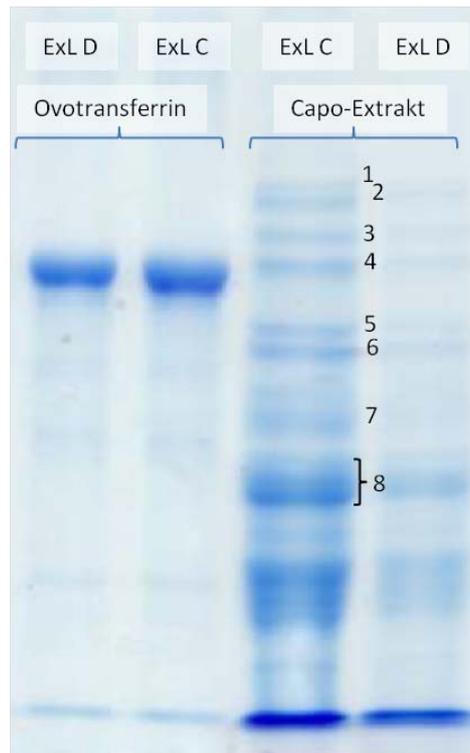


ABB. 46 EXTRAKTION DER PROTEINBANDEN AUS EDA-HÄLTIGEM GEL – AUSSCHNITT AUS ABB. 44; EXL...GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG

In Abb. 45 sind die Elektropherogramme der CGE-am-Chip-Trennung dargestellt. An Hand von Abb. 46 kann die Nomenklatur nachvollzogen werden.

Bei ca. 20 kDa tritt ein Signal auf, das aus der Gelbanden-Extraktionslösung D herrührt. Bei Probe Capo, Gelbanden-Extraktionslösung D, 8, das die vierfache Menge an Extrakt enthält, ist dieses Signal intensiver und das Maximum zu 26 kDa hin verschoben.

Das einzige weitere Signal in dieser Messung ist bei Probe Capo, Gelbanden-Extraktionslösung D, 2 bei ca. 342 kDa zu erkennen. Dieser Messwert liegt schon weit außerhalb des Kalibrationsbereich, da das oberste Kalibrationsprotein bei 240 kDa liegt. Da die schwersten Weizengluteninuntereinheiten üblicherweise bei CGE-am-Chip-Analysen eine Masse von rund 240 kDa tragen, handelt es sich bei dem Messsignal vermutlich nicht um die Weizengluteninuntereinheit 2. Die Behandlung des Gels vor der Extraktion (Entfärbung, hydrolytische Spaltung) könnte hingegen zu Gelbauprodukten geführt haben.

Zusätzlich zur Vermessung mittels CGE-am-Chip wurden ausgewählte Extrakte nach erfolgter Chip-Probenvorbereitung (inkl. Verdünnung mit 84 µL Wasser) am MALDI-TOF-MS vermessen. Zunächst wurde dafür eine Aufreinigung/Anreicherung der Proben mittels ZipTip Technologie (auf Ovotransferrin optimierte Methode, 3.7.1) durchgeführt. Die Eluate wurden mittels einer Vakuumzentrifuge zur Trockene gebracht, hernach mit 10 µL Elutionslösung (ACN + 0,1 % (v/v) TFA 1:1) pro Mikrozentrifugenröhrchen versetzt und 2 min ultraschallbehandelt. Die

Präparation erfolgte mit der Matrix Sinapinsäure durch Vorlegen von 1 μL Matrix am MALDI-MS-Target (2. Methode in 3.7.2)

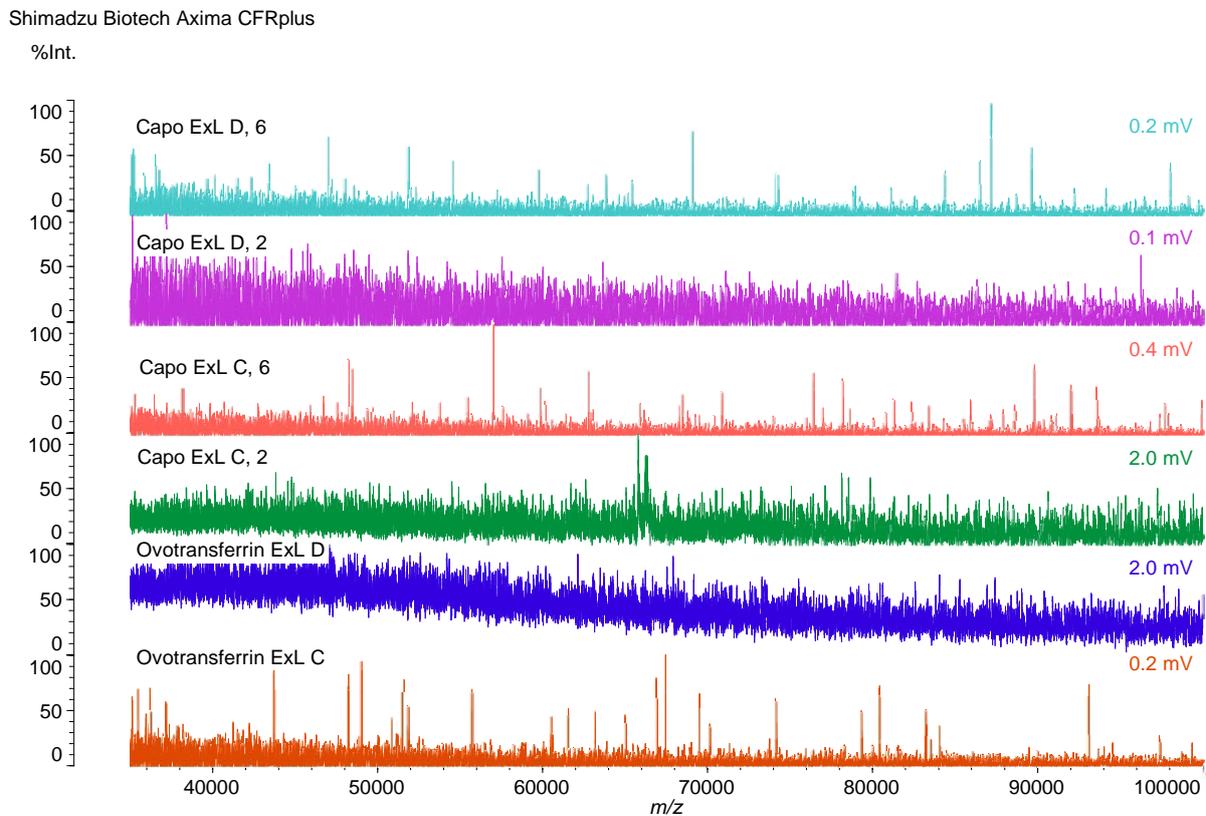


ABB. 47 MALDI-TOF VON PROTEINEXTRAKTEN AUS EDA-HÄLTIGEM SDS-PAGE-GEL NACH PROTEINCHIPPROBENVORBEREITUNG; EXL...GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG

Wie in Abb. 47 erkennbar, sind auch mittels MALDI-TOF-MS keine Proteinsignale messbar.

Eine dritte Möglichkeit, Proteinextrakte aus EDA-hältigen SDS-PAGE-Gelen zu vermessen wurde untersucht: CGE-am-Chip, Methode B (3.6.4.2 Protein 250 Assay). Diese Messmethode wurde für die direkte Vermessung von Weizenkornextrakten ausgeschieden, da Komponenten in der Weizenextraktionslösung die Messung stören. Die gewählten Gelextraktionslösungen sind jedoch mit der Messmethode kompatibel, außerdem ist sie empfindlicher als Methode A (Protein 230 Assay).

Jeweils 5 μL ausgewählter EDA-Gel-Extrakte (Ovotransferrin Gelbanden-Extraktionslösung C und D, Capo Gelbanden-Extraktionslösung C: 2 und 6, Capo Gelbanden-Extraktionslösung D: 2) wurden direkt gemäß 3.6.4.2 gelabelt und vermessen. Außerdem wurde mit der verbleibenden Menge an Extrakten eine Aufreinigung/Anreicherung mittels ZipTip Technik durchgeführt (auf Ovotransferrin optimierte Methode, 3.7.1). Die Eluate wurden mittels Vakuumentrifuge zur Trockene gebracht und mit jeweils 5 μL Rehydrierpuffer (3.2) solubilisiert sowie 4 min ultraschallbehandelt.

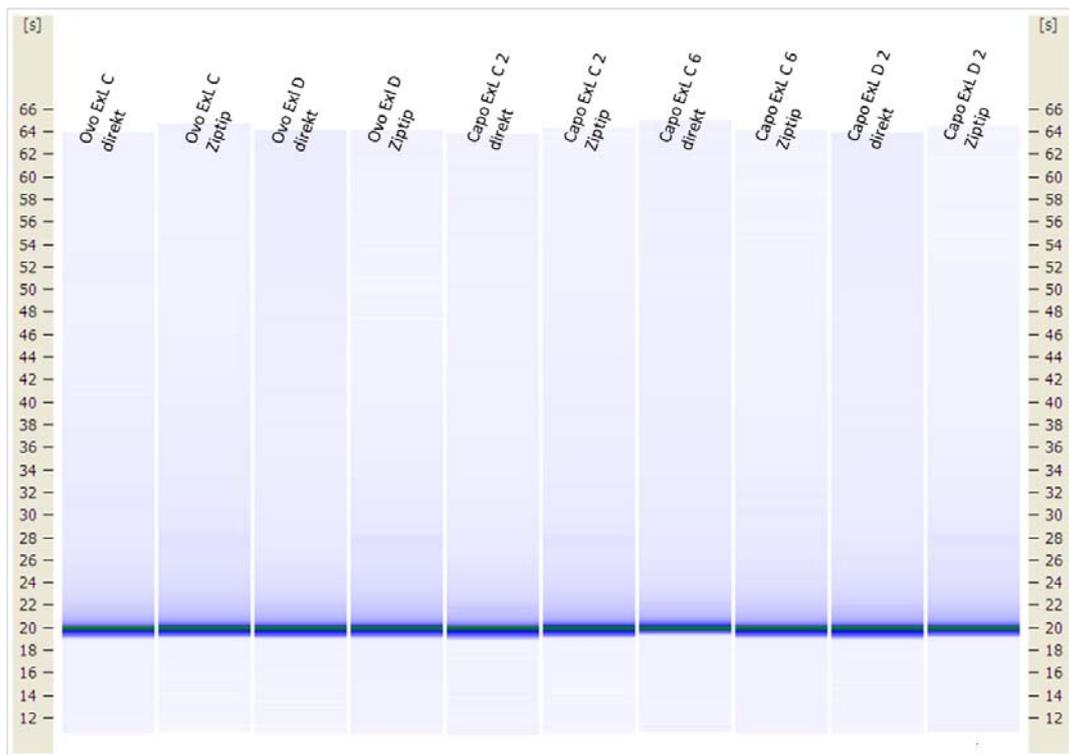


ABB. 48 CGE-AM-CHIP, METHODE B, VON EXTRAKTEN AUS EDA-HÄLTIGEN SDS-PAGE-GELEN; EXL...GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG

In Abb. 48 ist das Messergebnis dargestellt. Auch hier sind mittels CGE-am-Chip Methode B keine Gluteninuntereinheiten durch Extraktion aus EDA-hältigen SDS-PAGE-Gele detektierbar. Einige EDA-Gel-Extrakte (Capo Gelbanden-Extraktionslösung C: 1 und 8 sowie Capo Gelbanden-Extraktionslösung D: 1 und 8), wurden schlussendlich nach Anreicherung/Aufreinigung mittels ZipTip-Spitzen mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Hierfür wurde aus der gesamten verbleibenden Menge an EDA-Gel-Extrakt, nachdem die 4 µL für die Vermessung mittels CGE-am-Chip Methode A entnommen waren, mittels ZipTip-Technik Proteinprobe angereichert. Es waren jedoch wieder keine Gluteninuntereinheiten-Signale detektierbar (Ergebnis nicht gezeigt).

EXTRAKTION VON NZ-MEMBRANEN NACH ELEKTROBLOT

Die jeweils äußeren beiden Bahnen des Gels (Abb. 44) wurden abgetrennt und die Gelstücke gemäß 3.6.2.2 behandelt. Geblottet wurde 1 h bei 19 mA (0,8 mA / cm²).

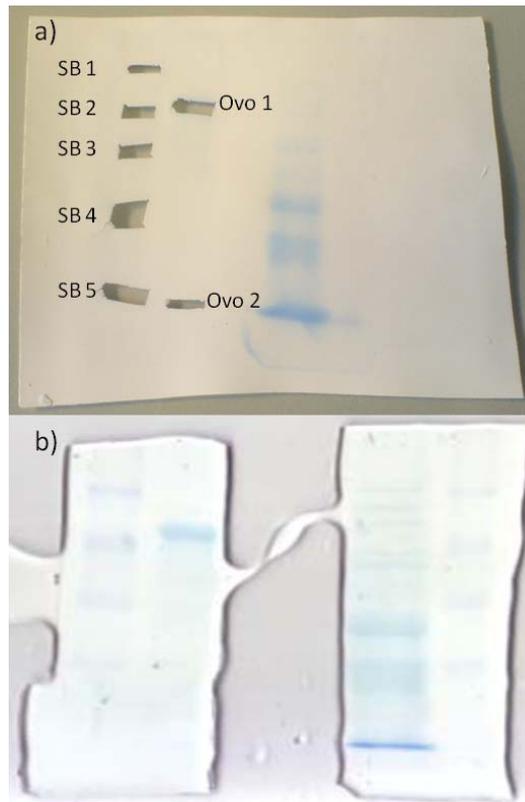


ABB. 49 (A): NZ-MEMBRAN, AUF DIE PROTEINE AUS EDA-HÄLTIGE SDS-PAGE-GELSTÜCKEN GEBLOTTET WURDEN; (B): ENTSPRECHENDE GELSTÜCKE NACH DEM BLOTTEN; SB...MOLEKULARGEWICHTSMARKER SEEBLUE

In Abb. 49 (A) ist die NZ-Membran gezeigt. Ausgeschnitten wurden zunächst die Ovotransferrinbande und dessen Frontmarkerbande sowie fünf Banden des Molekulargewichtsmarkers. Wie in Abb. 49 (B) erkennbar, war der Übertrag der Proteine auf die Membran trotz vorheriger Spaltung des EDA nicht quantitativ.

Die NZ-Membranbanden wurden in Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit je 50 μ L Gelbanden-Extraktionslösung A1 versetzt, ultraschallbehandelt, einen Tag bei 37°C und danach zwei Tage bei 4°C unter Schütteln extrahiert.

Die Gelbanden-Extraktionslösung enthält LDS, da LDS bzw. SDS für die Extraktion von Gluteninuntereinheiten notwendig ist. LDS führt jedoch zur Signalunterdrückung bei der Messung am MALDI-TOF-MS. Dies konnte auch bei MALDI-TOF-MS-Messungen von Ovotransferrin, das mit Gelbandenextraktionslösung A (kein LDS) bzw. A1 (mit LDS) versetzt war, beobachtet werden. Parallel zu den NZ-Extrakten wurde auch mit diesen Ovotransferrinlösungen eine Aufreinigung mittels ZipTip-Spitzen durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass diese Aufreinigung nicht ausreicht, um LDS derart aus der Gelbanden-Extraktionslösung A1 zu entfernen, dass Ovotransferrin wieder mittels MALDI-TOF-MS messbar wäre – siehe Abb. 50. Die Messung von Proteinbanden von der NZ-Membran nach Extraktion mit

Gelbandenextraktionslösung A1 am MALDI-TOF-MS war erwartungsgemäß nicht möglich (Ergebnis nicht gezeigt).

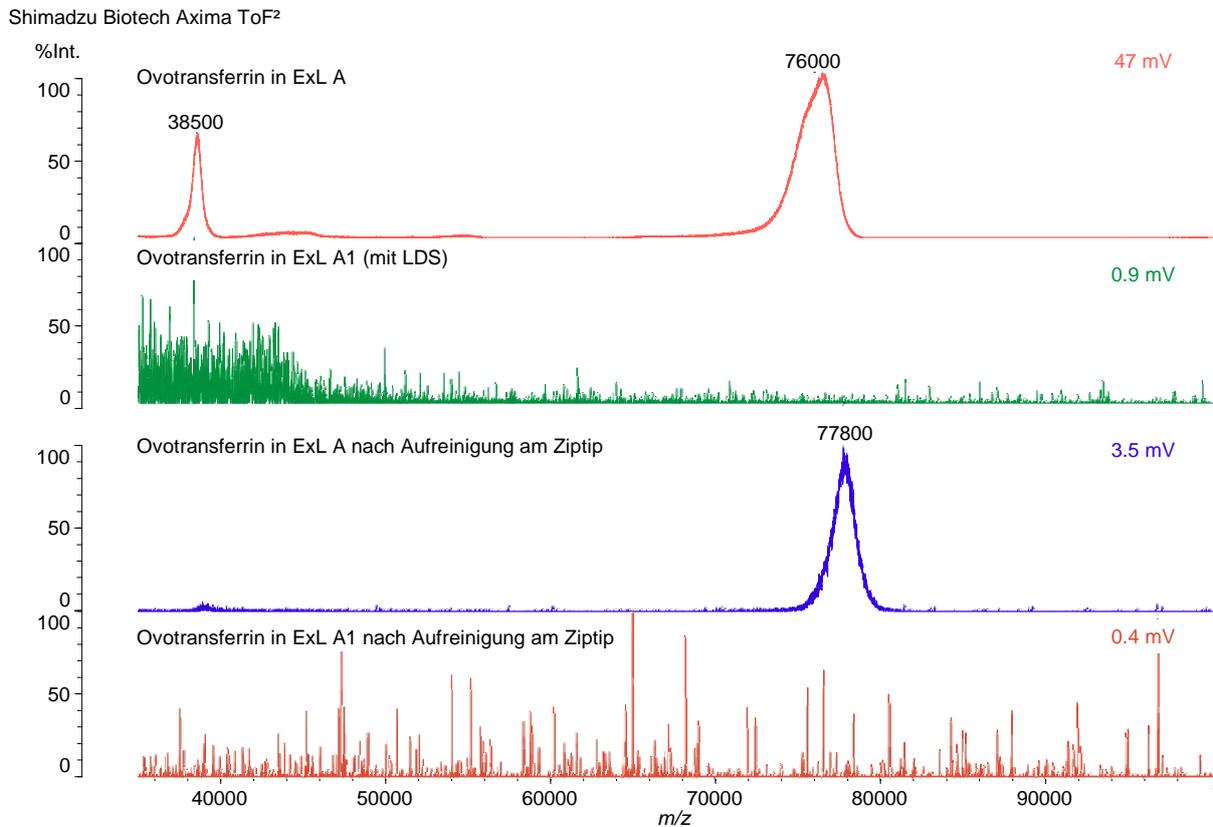


ABB. 50 MALDI-TOF MASSENSPEKTREN VON OVOTRANSFERRIN UNTER AN- UND ABWESENHEIT VON LDS UND NACH AUFREINIGUNGSPROZEDUR AM ZIPTIP; EXL...GELBANDEN-EXTRAKTIONSLÖSUNG

In Abb. 50 sind in den oberen zwei Zeilen die Massenspektren der Ovotransferrinlösung, jeweils mit der gleichen Menge an Extraktionslösung A bzw. A1 versetzt, gezeigt. In Anwesenheit von LDS ist das Proteinsignal vollständig unterdrückt (zweite Zeile von oben). In den beiden unteren Zeilen sind Massenspektren dieser Lösungen nach Anwendung der Aufreinigung mittels ZipTip-Spitzen gezeigt. Ovotransferrin, das mit Extraktionslösung A versetzt wurde, ist auch nach der Aufreinigung noch gut messbar, wenn auch mit deutlich geringerer Intensität als vor dem Aufreinigungsprozess (dritte Zeile von oben). Die LDS-haltige Ovotransferrinlösung konnte jedoch nicht, wie erhofft, durch die Aufreinigung hinreichend von LDS befreit werden, sodass Ovotransferrin messbar geworden wäre (vierte Zeile von oben). Aufgrund einer mäßig genauen Kalibration wird in der obersten Zeile die Masse des doppelt geladene Proteinsignals etwas zu hoch angegeben, was aber bei der hier untersuchten Fragestellung nicht weiter stört.

ELEKTROELUTION

Mit jeweils einer Bahn an Ovotransferrin und Capo wurde eine Elektroelution durchgeführt. Ausgeschnittene Gelteile (siehe Abb. 51) wurden in Mikrozentrifugenröhrchen einzeln der hydrolytischen Spaltung des EDA unterworfen (3.6.2.2) und danach in drei equilibrierte E-Röhrchen überführt (3.6.3.2).

Elektroelutionsbedingungen: 6,25 h bei 150V, danach 4 min bei entgegengesetzter Stromrichtung.

Je 4 μ L wurden für eine Messung mittels CGE-am-Chip entnommen („direkt“), je 1 mL des Eluats wurde in der Vakuumzentrifuge auf ca. 1/5 seines Volumens eingeeengt („konz.“ in Abb. 52). In Abb. 52 sind die Messergebnisse der CGE-am-Chip dargestellt. Es sind keine Proteinbanden messbar.

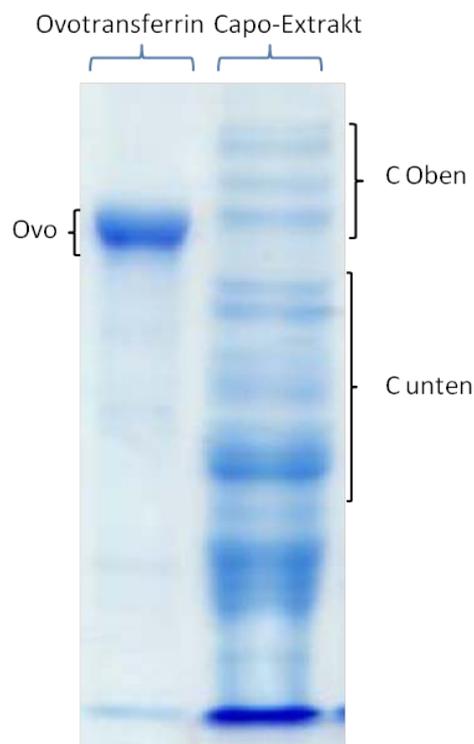


ABB. 51 AUSGESCHNITTENE BANDEN AUS EDA-HALTIGEM SDS-PAGE-GELS ZWECKS ELEKTROELUTION

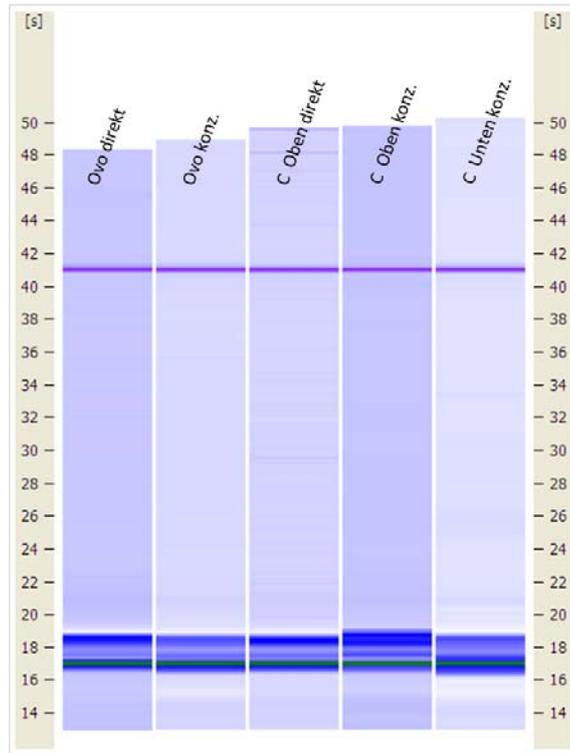


ABB. 52 CGE-AM-CHIP VON ELUATEN AUS EDA-HALTIGEN SDS-PAGE-GELBANDEN;
OVO...OVOTRANSFERRIN

4.6. VERGLEICH DER EXTRAKTIONSMETHODEN (EXTRAKTION AUS WEIZENKÖRNERN – 1- ODER 2-STUFIG)

Die Einstufige Extraktion aus Weizenkörnern wurde für alle Untersuchungen, so nicht anders angegeben, eingesetzt. Im Weiteren soll hier die zweistufige Extraktion diskutiert und anschließend ein Vergleich gezogen werden. Bei dieser zweistufigen Extraktionsmethode sollen in der ersten Stufe (umfasst mehrere Arbeitsschritte) die drei ersten Olson-Fractionen (Leukosin, Edesin und Gliadin) möglichst quantitativ abgetrennt werden. Im zweiten Schritt werden dann die Glutenine extrahiert.

12 verschiedene Extraktionsbedingungen wurden bezüglich Extraktionsmittelmenge und Einwirkzeit variiert (Tab. 6). Die zugehörigen Elektropherogramme sind in Abb. 53 dargestellt. Variante 9 (1 mL DMSO über Nacht bei RT, je 1 mL Propanol ca. 1h, 300 µL Extraktionslösung (Weizen, zweistufig)) hat sich als die geeignetste erwiesen, da hier alle Gluteninuntereinheiten intensiv genug erhalten bleiben. Von den Varianten 7 und 8 (1 mL DMSO über Nacht bei RT, je 1 mL Propanol ca. 20 min, 300 µL Extraktionslösung (Weizen, zweistufig)) wäre zu erwarten gewesen, dass sie aufgrund der kürzeren Einwirkzeit von Propanol höhere statt niedrigere Signalintensitäten der HMW-GUE zeigen. Die Erklärung liegt vermutlich in der Tatsache, dass es sich beim Weizenkorn für die Variante 8 um ein überdurchschnittlich kleines Korn (36 mg), bei Korn Nr. 9 jedoch um ein überdurchschnittlich großes Korn (60 mg) gehandelt hat. Die Korngröße scheint also ein wichtigeres Merkmal zur Erzielung von intensiven Signalen zu sein, als die Einwirkzeit von Extraktionsmittel.

Bei der Untersuchung wurde auch die Auswirkung des Farbstoffes Pyronin Y auf die CGE-am-Chip untersucht, der in der einstufigen Extraktionslösung der UPOV standardmäßig enthalten ist und als Frontmarker für die SDS-PAGE dient. Es konnte kein störender Einfluss des Farbstoffs auf die CGE-am-Chip Trennung festgestellt werden.

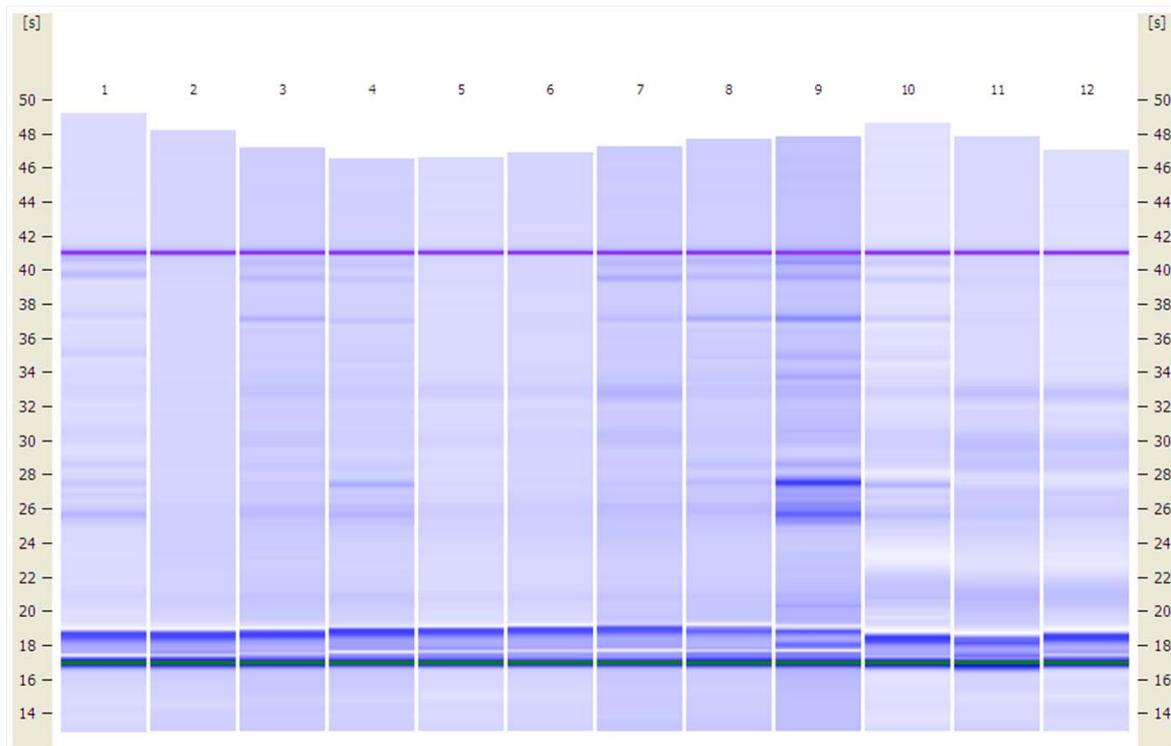


ABB. 53 ZWEISTUFIGE EXTRAKTION VON WEIZEN (CAPO) – 12 VERSCH. EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN GEMÄß TAB. 6

In Abb. 54 sind die Zwischenstufen der zweistufigen Extraktion inklusive Extraktion Nr. 9 aufgetragen. Weiters ist als „Einstufige Extr. 1“ ein einstufiger Extrakt von Capo gezeigt, der am selben Chip vermessen wurde und als „Einstufige Extr. 2“ ein einstufiger Extrakt von Capo, der schon zuvor vermessen wurde und Teil des Datensatzes zur Allelzuordnung (4.7) ist.

Da organische Komponenten die CGE-am-Chip Analyse stören, wurden je 2 mL der Extraktionsmittel A, C und E in der Vakuumzentrifuge zur Trockene gebracht und die Rückstände in je 10 μ L UHQ aufgenommen. Die Entfernung von DMSO war offensichtlich nicht vollständig, sodass die Messung fehlerhaft verlief. Addiert man die Elektropherogramme A, C, E und 9, so wäre zu erwarten, dass man ein Elektropherogramm ähnlich „Einstufige Extr.1“ erhält. Für Signale im Bereich der Gliadine und der α -Glutamine erfüllt sich diese Erwartung. Nicht jedoch für ein Signal im Bereich der HMW-GUE (mit Pfeil markiert). Das fehlende Signal ist jedoch in anderen Elektropherogrammen für Capo üblicherweise enthalten, so auch z.B. in „Einstufige Extr. 2“, sodass es sich bei dem fehlenden Signal vermutlich um eine Ausnahme handelt. Diese schwersten HMW-GUE haben eine Migrationszeit ähnlich dem UM, sodass es manchmal zu einer zufälligen Überlagerung mit dem UM kommt, wodurch ein Signalpeak weniger angezeigt wird.

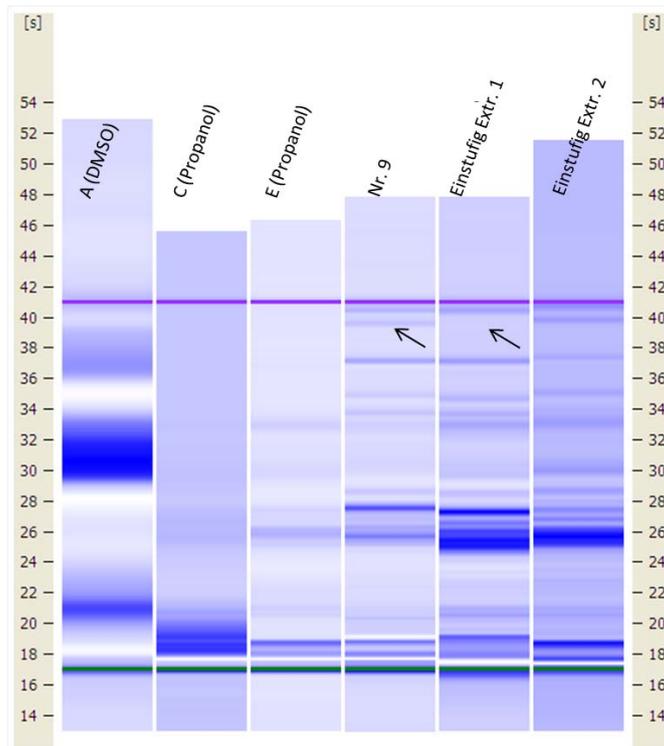


ABB. 54 ZWISCHENSTUFEN DER ZWEISTUFIGEN EXTRAKTION SOWIE ZWEI BEISPIELE FÜR EINSTUFIG EXTRAHIERTE WEIZENKÖRNER (CAPO)

4.7. STATISTIK

4.7.1. HIERARCHISCHE CLUSTERANALYSE

Ziel der Clusteranalyse ist es, in einem Dendrogramm zusammengehörige Elemente als nahe Verwandte („auf einem Ast sitzend“) zu ordnen.

Für die Clusteranalyse wurde mittels Featureextraktor aus den Messergebnissen vom 27. Oktober 2009 ein Datensatz erzeugt. 18 Features wurde gewählt und jeweils die maximale Intensität in diesem Bereich gewählt. Mittels später durchgeführter PCA (Kapitel 4.7.2) wurde festgestellt, dass zwei der Features nur minimal zur Variabilität des Datensatzes beitragen – diese zwei Features wurden für die Clusteranalyse nicht berücksichtigt. Die Daten wurden standardisiert, als Abstandsmaß wurde die euklidische Distanz gewählt und die gewählte Methode war Ward's Methode (Abb. 55).

Auch andere Clustermethoden und Abstandsmaße wurden untersucht – sie führen zu leicht veränderten Clustern, keinesfalls aber zu einer besseren Clusterung.

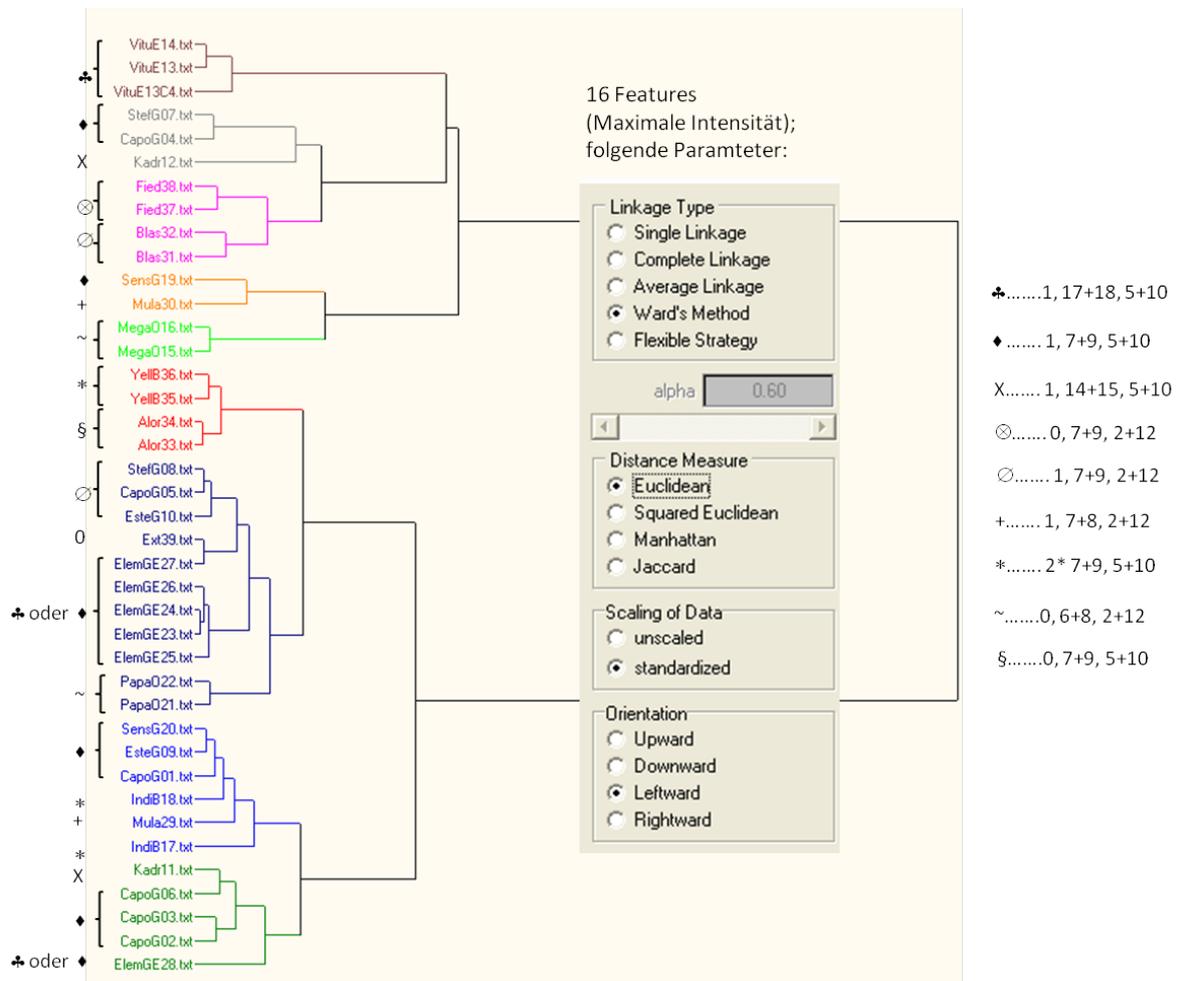


ABB. 55 DENDROGRAMM EINER HIERARCHISCHEN CLUSTERANALYSE. DIE DARGESTELLTEN SYMBOLE ZEIGEN DIE HMW-GUE DER JEWEILIGEN WEIZENSORTEN.

In Abb. 55 ist das Dendrogramm der Clusteranalyse dargestellt. Manche Weizensorten clustern zusammen (z.B. Vitus), manche nicht (z.B. Kadrijl) und teilweise bilden verschiedene Weizensorten mit gleicher Ausstattung an HMW-GUE Cluster (z.B. Capo, Estevan und Sensas). Im Allgemeinen muss man jedoch feststellen, dass mittels Clusteranalyse keine zufriedenstellende Gruppierung der Weizensorten erzielt werden konnte.

4.7.2. HAUPTKOMPONENTENANALYSE

Ziel der PCA als Gruppierungsinstrument ist es, dass im Plot der beiden ersten Hauptkomponenten jeweils zusammengehörige Elemente Gruppen bilden, die leicht voneinander unterschieden werden können.

Die PCA wurde im Anschluss an die Clusteranalyse (4.7.1) durchgeführt, sodass die selben Farben, die den Klassen in Abb. 55 zugewiesen wurden, auch in die PCA übernommen wurden. Der Datensatz wurde Mittelpunktzentriert. Wie in Abb. 56 erkennbar ist, decken 10 der 16 Hauptkomponenten 99 % der Varianz des Datensatzes ab.

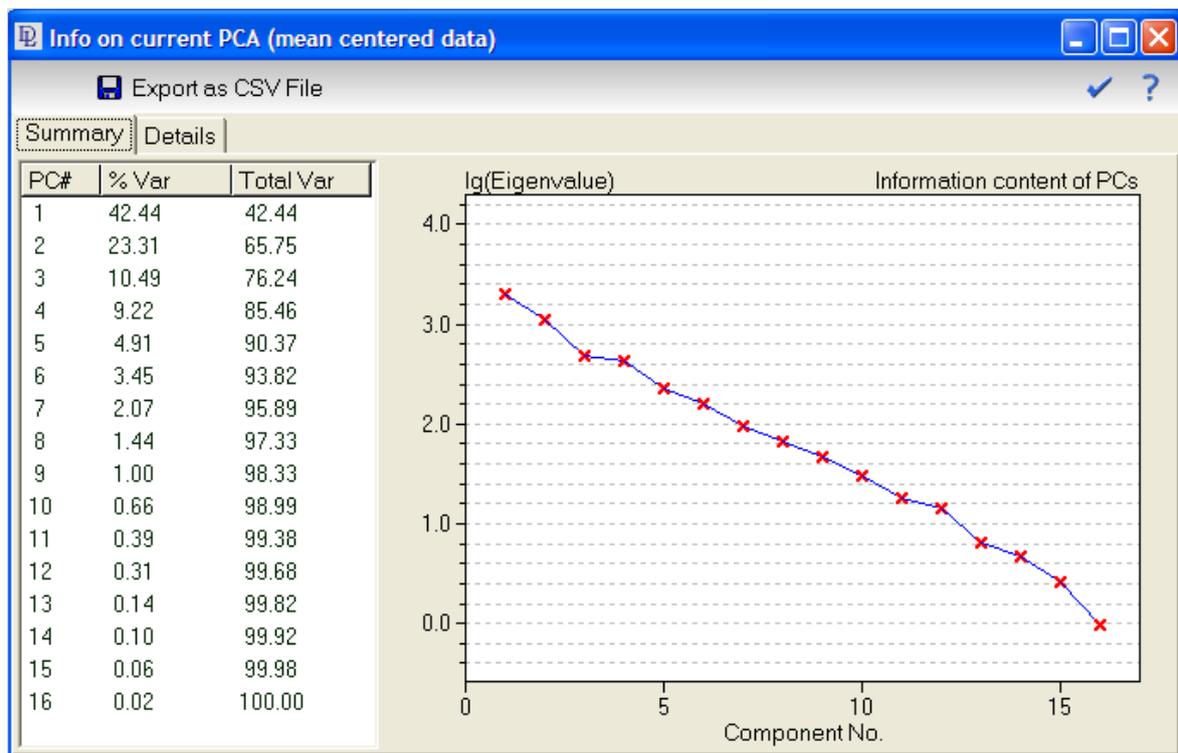


ABB. 56 PCA – ÜBERBLICK

In Abb. 57 sind die Scores der ersten beiden Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen. Anhand der Farbgebung kann man auf einen Blick erkennen, dass Proben, die in der

Clusteranalyse clustern und somit dieselbe Farbe zugewiesen bekommen haben, teilweise auch hier wieder Gruppen bilden, sich aber teilweise mit anderen Gruppen überschneiden. Die Nummern in Abb. 57 stimmen nicht mit den Probennummern überein, sondern wurden durch alphabetische Reihung der Weizensortennamen erzeugt (z.B. 1... Alora Pr. 33, 2...Alora Pr. 34 usw.) – eine entsprechende Legende ist in der Abbildung enthalten.

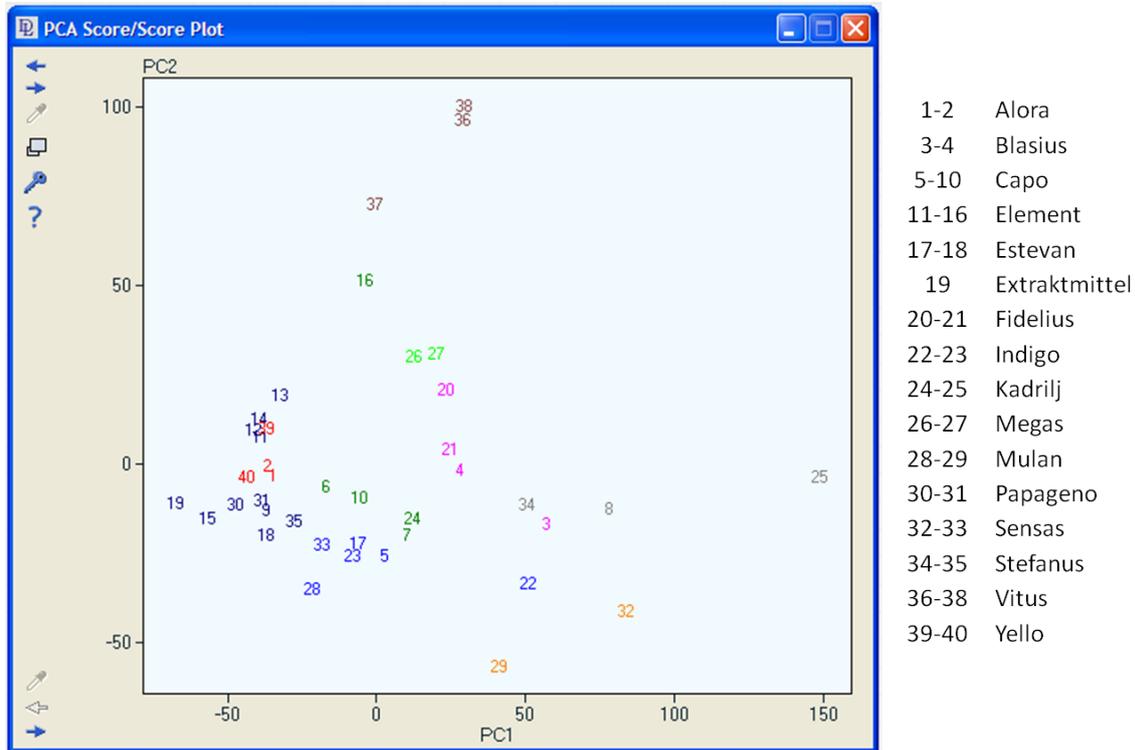


ABB. 57 PCA SCORES (HAUPTKOMPONENTE 1 GEGEN HAUPTKOMPONENTE 2 AUFGETRAGEN)

In Abb. 58 sind die Loadings der ersten beiden Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen. Die Nummern in dieser Darstellung bezeichnen die 16 Features des Datensatzes. Alle Features tragen zur Varianz des Datensatzes bei.

Eine Komprimierung des Datensatzes auf die ersten 10 Hauptkomponenten wurde unternommen, dies führte jedoch zu keiner nennenswerten Verbesserung der Gruppierung der Proben im Scoresplot (Ergebnis nicht gezeigt).

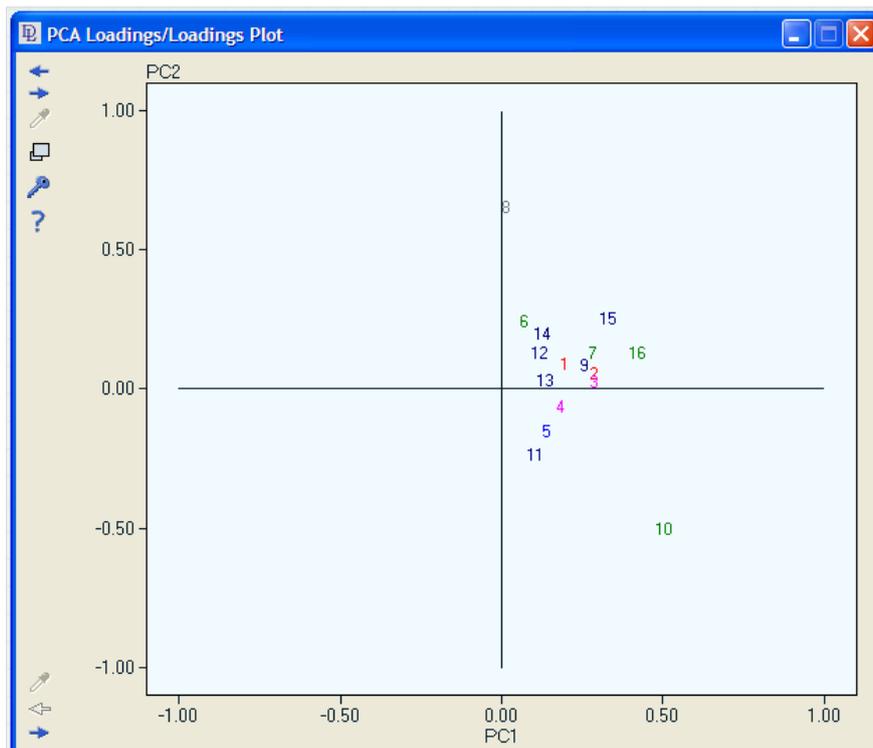


ABB. 58 PCA LOADINGS (HAUPTKOMPONENTE 1 GEGEN HAUPTKOMPONENTE 2 AUFGETRAGEN)

Mit keiner der angewendeten, unüberwachten statistischen Methoden konnte eine zufriedenstellende Gruppierung der Weizensorten gemäß ihrer HMW-GUE oder der Sorte erzielt werden. Dies überrascht jedoch nicht, wenn man sich die Größe des Datensatzes vor Augen führt. Die 38 untersuchten Proben bestehen aus 15 verschiedenen Weizensorten bzw. besitzen 9 verschiedene Kombinationen an HMW-GUE – 8 davon treten nur bei 1-2 Weizensorten im Datensatz auf. Zur Erzielung besserer Ergebnisse mit diesen statistischen Methoden müsste der Datensatz entweder drastisch vergrößert werden, oder aber die Anzahl der Gruppen, in die eingeteilt werden soll herabgesetzt werden.

4.7.3. VISUELLE ZUORDNUNG

Als eine Methode des überwachten Lernens sollte eine visuelle Zuordnung der Signale zu Gelbänden versucht werden. Der gesamte Datensatz wurde in zwei Untergruppen, einen Listenerstellungs-Datensatz und einen Validierungsdatsatz geteilt.

Folgende Weizenproben wurden für den Datensatz zur Erstellung der Liste der Molekulargrößen ausgewählt (vgl. Tab. 5): 04, 11, 14, 15, 30, 31, 33, 35, 37.

Kriterien für diese Auswahl waren hohe Signalintensität und die Wahl eines möglichst typischen Vertreters für die entsprechende HMW-GUE-Kombination, sofern mehr als zwei Proben für diese Auswahl zur Verfügung standen.

Die genaue Vorgehensweise soll hier nur exemplarisch an den ersten zugeordneten HMW-GUE gezeigt werden:

2* ... 202,6 kDa (an dieser Stelle tritt ein Signal nur bei Probe 35 auf)

8 ... ≈ 110 kDa und 140 kDa (diese Signale in Probe 30 (HMW-GUE 7+8) aber nicht Probe 31 (HMW-GUE 7+9))

9 ... ≈ 120 kDa (Umkehrschluss aus obiger Zeile)

1 ... 214-220 kDa (aber unerwartetes Signal bei 212 kDa bei Probr 33)

usw.

Die erstellte Liste enthält teilweise Molekulargewichtsbereiche, sofern dieselbe HMW-GUE mehrmals im Datensatz vorhanden war, teilweise jedoch nur ein Molekulargewicht für einzigartige HMW-GUE. Durch die Validierung dieser Liste wurden die Molekulargewichtsbereiche erweitert. Einerseits ist im gesamten Datensatz jede Weizensorte mind. 2 Mal vertreten, andererseits treten manche HMW-GUE in vielen der Weizensorten auf. Somit ist in den Molekulargewichten der validierten Liste sowohl die biologische Reproduzierbarkeit als auch die Methodenreproduzierbarkeit wiedergespiegelt.

HMW-GUE	Signal 1 [kDa]	Beschreibung	Signal 2 [kDa]	Beschreibung	Signal 3 [kDa]	Beschreibung
1	214-222		/		/	
2*a	203-204		/		/	
2*b	184	Schulter, rechts von 7	/		/	
6+8	169-173	vorher negativ	137-140		110-122	
7+8	172-183	hoch & scharf	137-140		110-122	
7+9	172-183		117-123		/	
14+15	176-177	sehr hoch, rel. schmal	123	klein & breit		
17+18	163-169	sehr hoch, rel. schmal	121-122	klein & breit	110	klein
2+12	229-240		124-130		121-123	fast Schulter von vorigem 12erSignal; ev. von 9 überlagert
5+10	223-240		138-146		128-132	niedriger als 12 am dieser Stelle
Alora	211-212		/		/	

TAB. 26 MOLEKULARGEWICHTE DER HMW-GUE AUF CGE-AM-CHIP, ERMITTELT DURCH VISUELLEN VERGLEICH

In Tab. 26 ist die validierte Liste der der Molekulargewichte der HMW-GUE inklusive Beschreibungen der Signalform gezeigt. Zur Erstellung dieser Liste wurden ausschließlich die Messungen der Weizenproben vom 27. Oktober 2009 verwendet (jede Probe ein Mal gemessen, Probe 13 zwei Mal gemessen). Allele, die paarweise auftreten, sind in dieser Liste auch als Paare angeführt. Einerseits kann für Signale von paarweisen Allelen, die nur in einer Kombination im Datensatz vorhanden sind, keine eindeutige Zuordnung eines Signals zu einer HMW-GUE getroffen werden. Andererseits erleichtert das Auftreten von Doppel- bzw. Dreifachsignalen die Zuordnung zu den Gluteninuntereinheiten, da viele Überschneidungen der Molekulargewichtsbereiche auftreten.

Im Vergleich zur SDS-PAGE gibt es einige Abweichungen in der Liste der CGE. So für einige laut Payne et al.⁹ als Paar aufgefasste Allele drei Signale auf (z.B. 6+8, 7+8, 2+12). Außerdem tritt die HMW-GUE 2* in zwei Varianten mit stark unterschiedlichem Molekulargewicht auf. Weiters tritt für die Weizensorte Alora ein zusätzliches Signal auf, das keiner der HMW-GUE zugeordnet werden kann. Die Unterschiede in der Größenzuweisung der HMW-GUE mittels SDS-PAGE und CGE-am-Chip wurde schon in Kapitel 4.5.2 diskutiert. Vermutlich bewirken die unterschiedlichen Trennbedingungen (quervernetztes Gel bei SDS-PAGE bzw. unvernetztes Gel in schmaler Kapillare bei CGE-am-Chip), dass Proteine, die im SDS-PAGE immer komigrieren jetzt aufgetrennt werden.

Es existieren viele Überschneidungen der Migrationsbereiche unterschiedlicher HMW-GUE, sodass für eine richtige Zuordnung auch der Signalform Beachtung geschenkt werden sollte. Außerdem sollte unbedingt die Tatsache berücksichtigt werden, dass viele Signale nur in Zweier- oder Dreier-Kombinationen auftreten. So können z.B. die HMW-GUE 2 (229-240 kDa) und 5 (223-240 kDa) nur durch die gleichzeitige Auftreten weiterer niedrigermolekularer Signale unterschieden werden, die vermutlich von den HMW-GUE 10 und 12 herrühren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Übertragbarkeit der SDS-PAGE Methodik von Weizenextrakten zwecks Sortenerkennung und Homogenitätsprüfung auf die CGE-am-Chip Methode untersucht werden.

Trotz der Miniaturisierung der Analysenstrecke sind HMW-GUE mittels CGE-am-Chip elektrophoretisch trenn- und detektierbar. Der Umstieg auf CGE-am-Chip ist jedoch nicht trivial, da sich das Migrationsmuster und die Migrationsreihenfolge der HMW-GUE bei beiden Methoden signifikant unterscheiden.

Die Robustheit der Methode wurde untersucht – die Intra- und Interchipse reproduzierbarkeit hat sich bezüglich der Migrationszeit als sehr hoch erwiesen. Die Signalintensität zeigt jedoch keine hohe Reproduzierbarkeit. Weizenextrakte sind auch nach vierwöchiger Lagerung bei 4°C mit Reproduzierbarkeiten im Bereich der Methodenreproduzierbarkeit unproblematisch vermessen. Auch nach achtwöchiger Lagerung bei 4°C lässt sich für die meisten Proben ein aussagekräftiges CGE-am-Chip-Elektropherogramm erzeugen. Weizenextrakte können bis zu zwei Mal aufgetaut und wieder eingefroren werden, ohne dass sich negative Auswirkung auf die Vermessbarkeit mittels CGE-am-Chip zeigen.

Um trotz der Veränderung des Migrationsmusters zweifelsfreie Zuordnungen der HMW-GUE-Banden zu erlauben, wurde versucht, mittels SDS-PAGE aufgetrennte Weizenproteine aus dem Gel zu extrahieren und erneut durch CGE-am-Chip zu vermessen. Die gewählten Extraktionsmethoden waren Schütteln in 5 unterschiedlichen Extraktionsmittel, Elektroelution und Elektroblott mit anschließender Extraktion von der Membran. Neben zwei unterschiedlichen SDS-PAGE-Gelzusammensetzungen wurde auch eine SDS-PAGE Technik, die teilweise aus einem hydrolytisch spaltbaren Quervernetzter besteht, untersucht inwieweit diese eine Extrahierbarkeit der Weizenproteine zulassen. Mit keiner der gewählten Methoden war es aber möglich, nachweisbare Mengen an HMW-GUE zu extrahieren – als zusätzliche Nachweismethoden wurden MALDI-TOF-MS, SDS-PAGE mit Silberfärbung und ein hochempfindlicher CGE-am-Chip-Assay mit vorangeschalteter Fluoreszenzderivatisierung gewählt. Dies hängt auch mit den speziellen physiko-chemischen Eigenschaften der HMW-GUE Protein zusammen.

Zusätzlich wurde die Möglichkeit der CGE-am-Chip-Banden(Peak)zuordnung mittels statistischer Methoden untersucht. Zwei unüberwachte statistische Methoden (Hierarchische Clusteranalyse und PCA) und eine überwachte Methode (visuelle Zuordnung) wurden angewendet. Der zur Verfügung stehenden Datensatz (38 unterschiedliche Proben, 15 verschiedene Weizensorten, 9 unterschiedliche HMW-GUE-Sätze) war zu uneinheitlich, um mittels unüberwachten statistischen Methodeneine eindeutige Zuordnung treffen können. Durch Vermessen größerer bzw. einheitlicherer Datensätze könnte in Zukunft jedoch auch mittels

dieser Strategie und den aufgezeigten Methoden eine Zuordnung gelingen. Mit der überwachten statistischen Methode ist die Zuordnung jedoch gelungen. Aus der visuellen Zuordnung ergeben sich einige überraschende Erkenntnisse für die CGE-am-Chip von Weizenextrakten. So liefern manche Allele nicht zwei, sondern drei Signale. Eine Aufspaltung der als 2* bezeichnete SDS-PAGE-Bande in zwei Untergruppen mit sehr unterschiedlichen Migrationszeiten wurde für zwei verschiedene Weizensorten beobachtet (jeweils nur eine der Varianten kommt bei einer Sorte vor). Für die Weizensorte Alora konnte ein zusätzliches Signal im CGE-am-Chip-Elektropherogramm beobachtet werden, das bisher noch nicht beschrieben war.

6. ABSTRACT

The aim of this master thesis was to investigate whether the SDS-PAGE method for wheat grain extracts for variety and homogeneity control is transferable to the highthroughput CGE-on-a-chip method.

Despite the miniaturization of the separating segment, HMW-GUE can be separated and detected in the lab-on-a-chip system. Due to changing migration patterns and migration sequences of the HMW-GUE, however, a change of method is nontrivial.

The validity of the method was tested – the intra- and inter-chip reproducibility of the migration time is rather high, the signal intensity is however not very reproducible. After storage at 4°C for four weeks wheat extracts can still be measured with good reproducibility close to the method's technical reproducibility. Even after storage at 4°C for eight weeks conclusive CGE-on-a-chip electropherograms could be obtained. Extracts of wheat can undergo up to two thaw-freeze cycles without causing degrading results obtained by means of the CGE-on-a-chip technique.

In order to assign protein bands despite the changed migration sequence it was tried to extract wheat proteins which had been separated via SDS-PAGE from those gels and measure them on the chip. The chosen methods of extraction were shaking with five different eluants, electroelution and electroblotting with subsequent elution from the membrane. In addition to two different compositions of SDS-PAGE-gels, a SDS-PAGE-gel with partly hydrolytically cleavable crosslinker was investigated in terms of its extractability of wheat proteins. None of these methods allowed extracting detectable amounts of HMW-GUE. Additional methods of detection were MALDI-TOF-MS, SDS-PAGE with silver staining and a high sensitivity CGE-on-a-chip assay with direct fluorescence dye labeling. The difficulties are closely associated with the special physico-chemical quality of the HMW-GUE proteins.

The possibilities of protein band assignment by means of statistical methods were examined, too. Two unsupervised statistical methods (hierarchical cluster analysis and PCA) and one supervised method (visual assignment) were evaluated. The available data set (38 different samples, 15 different wheat varieties, 9 different HMW-GUE-sets) were too heterogeneous in order to obtain a clear assignment through unsupervised statistical methods. Larger and more homogeneous data sets could however allow a wheat assignment through unsupervised statistical methods in the future. On the other hand an assignment was obtained successfully through a supervised statistical method (visual assignment).

Based on this method some surprising results could be obtained for certain wheat protein bands. Some alleles showed not two, but three signals. Splitting of the SDS-PAGE band called 2*

to two signals with very different migration times could be observed for two different wheat varieties (for each wheat variety, respectively, only one 2* signal). An additional signal could be observed for the CGE-on-a-chip electropherogram of the wheat variety Alora which has not been described so far.

7. ANHANG

7.1. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Nations, F. a. a. O. O. T. U. (2010). "Faostat."
from <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- [2] Reiner, H. (2006). Getreide und Gentechnik. Wien, Bundesministerium für Gesundheit und Frauen, Sektion IV.
- [3] Freder, W. (2010). Handbuch für Lebensmittelchemiker, Springer.
- [4] Souci, S. W. and H. Kraut (1994). Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers.
- [5] Ternes, W., A. Täufel, et al. (2005). Lebensmittel-lexikon. Hamburg, Behr's Verlag.
- [6] Belitz, H.-D., W. Grosch, et al. (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Berlin Heidelberg, Springer.
- [7] Payne, P. I. (1987). "Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **38**: 141-153.
- [8] Pflanzenzüchtungen, I. V. Z. S. V. (1994). Weizen - Richtlinien für die Durchführung der Prüfung auf Unterscheidbarkeit, Homogenität und Beständigkeit.
- [9] Payne, P. I. and G. J. Lawrence (1983). "Catalogue of alleles for the complex gene gene loci, glu-a1, glu-b1, glu-d1, which code for high molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat." Cereal Research Communications **11**: 29-35.
- [10] Inra (2010, 19.02.2010). "International wheat genome sequencing consortium."
from <http://www.wheatgenome.org>.
- [11] Killermann, B., V. Brönneke, et al. (1999). "Einfluß hochmolekularer Glutenin-Untereinheiten und D-Zonen Gliadine auf die Backqualität deutscher Weizensorten." Schriftenreihe der bayrischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau **3**: 51-66.
- [12] Zeleny, L. (1947). "A simple sedimentation test for estimating the bread baking and gluten qualities of wheat flour." Cereal Chemistry **24**: 465-475.
- [13] Payne, P., J. A. Seekings, et al. (1990). Contribution of allelic variation of glutenin subunits and gliadins to bread-making quality. T. I. W. O. G. Proteins. Winnipet: 504-511.
- [14] Cerny, J., A. Sasek, et al. (1992). "An evaluation of bavarian and lower austrian new varieties of winter wheat by means of genetic protein markers of baking quality." Scientia Agriculturae Bohemoslovaca **2**: 113-123.
- [15] Lelley, T. and S. Gröger (1993). Einfluss der HMW-, und LMW-Glutene, der Gliadine und der 1BL/1RS Translokationen auf die Backqualität des Weizens. Bericht über die 44. Arbeitstagung 1993 der Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtler im Rahmen der

"Vereinigung der österreichischen Pflanzenzüchter". BAL Gumpenstein, Vereinigung der österreichischen Pflanzenzüchter: 13-19.

- [16]Wien, C.-B. (2009, 07.07.2009). "Selektion von Weizensorten hinsichtlich Backqualität mittels Gelelektrophorese."
from <http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/weizensorten-und-backqualitaet>.
- [17]Lottspeich, F. and J. W. Engels (2006). Bioanalytik. Heidelberg, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
- [18]Rabilloud, T., G. Carpentier, et al. (1988). "Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite." Electrophoresis **9**(6): 288-291.
- [19]Bousse, L., S. Mouradian, et al. (2001). "Protein sizing on a microchip." Anal Chem **73**(6): 1207-1212.
- [20]Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4." Nature **227**(5259): 680-685.
- [21]Bornemann, S., B. Rietschel, et al. (2010). "A novel polyacrylamide gel system for proteomic use offering controllable pore expansion by crosslinker cleavage." Electrophoresis **31**(4): 585-592.
- [22]H.Luftensteiner, D. (2010). Österreichische Sortenliste 2010. Wien, Bundesamt für Ernährungssicherheit - Institut für Sortenwesen.
- [23]H.Luftensteiner, D. (2010, 1.04.2010). "Österreichische beschreibende Sortenliste."
from <http://www.baes.gv.at/pflanzensorten/oesterreichische-beschreibende-sortenliste/getreide/sommerweizen-sommerweichweizen/>.
- [24]Ages (2008). Winterweizen. <http://www.ages.at/ages/landwirtschaftliche-sachgebiete/sorte/bsl/getreide/winterweizen-winterweichweizen/>. Wien, 2008.
- [25]Saatgut, I. F. (2010, 09 August 2010). "Willkommen im Institut für Saatgut."
from <http://www.ages.at/ages/ueber-uns/landwirtschaft/institut-fuer-saatgut/>.
- [26]Uthayakumaran, S., Y. Listiohadi, et al. (2006). "Rapid identification and quantitation of high-molecular-weight glutenin subunits." Journal of Cereal Science **44**(1): 34-39.
- [27]Heukeshoven, J. and R. Dernick (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in phastsystem development unit .1. Staining of sodium dodecyl-sulfate gels." Electrophoresis **9**(1): 28-32.
- [28]Novagen (2008). User protocol tb422 rev. F 0508 d-tube dialyzers. <http://www.merck-chemicals.com/>.
- [29]Technologies, A. (2006). Agilent protein 230 kit guide. Waldbronn. **G2938-90054**.
- [30]Technologies, A. (2009). Agilent high sensitivity protein 250 kit guide. Waldbronn. **G2938-90310**.
- [31]Technologies, A. (2007). Agilent protein 230 kit quick start guide. Waldbronn. **G2938-90055**.

- [32]Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons." Analytical Chemistry **60**(20): 2299-2301.
- [33]Lohninger, J. MS feature extractor. Wien.
- [34]Lohninger, J. Datalab, Epina.
- [35]Technologies, A. (2006). New series ii protein 230 assay for the agilent 2100 bioanalyzer. **5989-4816EN**.
- [36]Werner, W. E., J. E. Wiktorowicz, et al. (1994). "Wheat varietal identification by capillary electrophoresis of gliadins and high-molecular-weight glutenin subunits." Cereal Chemistry **71**(5): 397-402.
- [37]Weegels, P. L., R. J. Hamer, et al. (1995). "Rp-hplc and capillary electrophoresis of subunits from glutenin isolated by sds and osborne fractionation." Journal of Cereal Science **22**(3): 211-224.
- [38]Sutton, K. H. and J. A. Bietz (1997). "Variation among high molecular weight subunits of glutenin detected by capillary electrophoresis." Journal of Cereal Science **25**(1): 9-16.
- [39]Bean, S. R. and G. L. Lookhart (1999). "Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis of wheat proteins. 1. Uncoated capillaries." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(10): 4246-4255.
- [40]Stubiger, G., M. Marchetti, et al. (2005). "Characterisation of intact recombinant human erythropoietins applied in doping by means of planar gel electrophoretic techniques and matrix-assisted laser desorption/ionisation linear time-of-flight mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **19**(5): 728-742.
- [41]Jorgensen, C. S., M. Jagd, et al. (2004). "Efficacy and compatibility with mass spectrometry of methods for elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and polyvinylidene difluoride membranes." Analytical Biochemistry **330**(1): 87-97.
- [42]Fountoulakis, M. and B. Takacs (2001). "Effect of strong detergents and chaotropes on the detection of proteins in two-dimensional gels." Electrophoresis **22**(9): 1593-1602.

7.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Chip Design – Figure 1 nach Anal. Chem. 2001, 73, 1207-1212 vgl. Bildnachweis.....	12
Abb. 2 Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.....	13
Abb. 3 Schematische Darstellung der zweistufigen Extraktion.....	28
Abb. 4 Elektropherogramm der Methode B, Protein 250 High Sensitivity Assay von Capo (Probe 5), konzentrierte Probe.....	46
Abb. 5 Elektropherogramm der Methode A, Protein 230 Assay von Capo (Probe 5), konzentrierte Probe	47
Abb. 6 Elektropherogramm der Methode A, Protein 230 Assay von Capo (Probe 5), Assay, Extrakt verdünnt 1:1 mit UHQ.....	47
Abb. 7 Simuliertes Gelbild der Probe 02 (Capo), von der anhand der drei gekennzeichneten Signale die Intra- und Interchipreproduzierbarkeit ermittelt wurde.	50
Abb. 8 Elektropherogramm der Extraktionslösung (Weizen, einstufig), 1:1 verdünnt mit UHQ nach 2 Tagen Lagerung bei 4°C.....	51
Abb. 9 Elektropherogramm der Extraktionslösung (Weizen, einstufig) nach 8 Wochen Lagerung bei 4°C	52
Abb. 10 Überlagerte Elektropherogramme der Probe 2 (Capo) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe. 5 Messsignale wurden für die nähere Untersuchung der Haltbarkeit ausgewählt.....	53
Abb. 11 Simuliertes Gelbild der Probe 02 (Capo) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe.	54
Abb. 12 Überlagerte Elektropherogramme der Probe 13 (Vitus) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe. 7 Messsignale wurden für die nähere Untersuchung der Haltbarkeit ausgewählt.....	55
Abb. 13 Simuliertes Gelbild der Probe 13 (Vitus) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe.....	55
Abb. 14 Überlagerte Elektropherogramme der Probe 30 (Mulan) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe. 7 Messsignale wurden für die nähere Untersuchung der Haltbarkeit ausgewählt.....	56
Abb. 15 Simuliertes Gelbild der Probe 30 (Mulan) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe.....	57
Abb. 16 Elektropherogramm der Extraktionslösung (Weizen, einstufig) nach drei Frier-Auftau-Zyklen. Zusätzlich zu den Systempeaks (LM, UM sowie Lösungsmittelpeaks) wurden auch andere Signale annotiert.....	59

Abb. 17 Überlagerte Elektropherogramme der Probe 02 (Capo) der drei Frier-Auftau-Zyklen. 5 Messsignale wurden für die nähere Untersuchung der Haltbarkeit ausgewählt.	60
Abb. 18 Simuliertes Gelbild der Probe 02 (Capo) der drei Frier-Auftau-Zyklen.....	60
Abb. 19 Überlagerte Elektropherogramme der Probe 13 (Vitus) der drei Frier-Auftau-Zyklen. 7 Messsignale wurden für die nähere Untersuchung der Haltbarkeit ausgewählt.	61
Abb. 20 Simuliertes Gelbild der Probe 13 (Vitus) der drei Frier-Auftau-Zyklen.....	62
Abb. 21 Überlagerte Elektropherogramme der Probe 30 (Mulan) der drei Frier-Auftau-Zyklen. 7 Messsignale wurden für die nähere Untersuchung der Haltbarkeit ausgewählt.	63
Abb. 22 Simuliertes Gelbild der Probe 30 (Mulan) der drei Frier-Auftau-Zyklen.	63
Abb. 23 Simuliertes Gelbild eines der zwei Messungen zur Berechnung der Intrachipreproduzierbarkeit	65
Abb. 24 Falsche Zuordnung des LM (Vitus, Probe 13, 27.10.2009).....	67
Abb. 25 Automatische Integration führt nicht immer zum gleichen Ergebnis (Capo, Probe 2, 27.10 und 22. 10. 2009).....	67
Abb. 26 Interferenz des UM mit Messsignalen (Mulan, Probe 29, 19.11., 6.10. und 21.10. 2010).....	68
Abb. 27 Elektropherogramm einer Weizenprobe, präpariert gemäß Methode A nach fünfstündiger Lagerung (Fiedelius, Probe 38).....	69
Abb. 28 Figure 4 aus Journal of Cereal Science 44 (2006) 34-39 vgl. Bildnachweis.....	71
Abb. 29 (a): SDS-PAGE von Capo, 29.12.2009, (b): Simuliertes Gelbild dreier unterschiedlicher Messungen von Capo, Probe 2, v.l.n.r.: 27.10.2009, 22.10.2009, 25.03.2010 – zweistufige Extraktion vgl. 3.5.1.2	71
Abb. 30 Extrakte von Proteinbanden von SDS-PAGE Gel, Methode Lämmli, einen Tag extrahiert bei 4°C, anschließend 3 h bei 37°C, ultraschallbehandelt. Extrakte von Gelbanden-Extraktionslösung (ExL) A wurden an der Vakuumzentrifuge zur Trockenen rotiert und mit UHQ solubilisiert.....	73
Abb. 31 Extrakte von Proteinbanden von SDS-PAGE Gel, Methode Lämmli, drei Tage extrahiert bei 4°C, ultraschallbehandelt, mit und ohne vorherigem Entfärben (DS). Extrakte von Gelbanden- Extraktionslösung (ExL) A1 wurden an der Vakuumzentrifuge zur Trockenen rotiert und mit UHQ solubilisiert.....	74
Abb. 32 Extrakte von Proteinbanden von SDS-PAGE Gel, Methode Lämmli, drei Tage Extrahiert bei 4°C, ultraschallbehandelt, mit und ohne vorherigem Entfärben (DS). Alle Extrakte wurden zwecks Konzentrationssteigerung an der Vakuumzentrifuge zur Trockenen rotiert und in UHQ solubilisiert. ExL...Gelbanden-Extraktionslösung.....	75
Abb. 33 Elektropherogramm des Extraktes der Proteinbande E6, Gelbanden-Extraktionslösung D ohne DS. Entspricht Bahn 6 in Abb. 31	76
Abb. 34 Extrakte von Proteinbanden von SDS-PAGE Gel, Methode Lämmli, drei Tage Extrahiert bei 4°C, ultraschallbehandelt. Gelbanden-Extraktionslösung (ExL) D alt ist jene, die für Messungen in Abb. 31, Abb. 32 und Abb. 33 verwendet wurde, (4 Tage alt), ExL D neu wurde frisch bereitet..	76

Abb. 35 Extrakte von Proteinbanden von SDS-PAGE Gel, Methode Lämmli, drei Tage Extrahiert bei 4°C, ultraschallbehandelt. Gelbanden-Extraktionslösung (ExL D) alt ist jene, die für Messungen in Abb. 31, Abb. 32 und Abb. 33 verwendet wurde, (4 Tage alt), ExL D neu wurde frisch bereitet. Alle Extrakte wurden zwecks Konzentrationssteigerung an der Vakuumzentrifuge zur Trockenrotiert und mit UHQ resolubilisiert.	77
Abb. 36 Elektroelution der vereinigten Capo-Banden B2, E2 und F2 (Entspricht HMW-GUE 5 gemäß ⁹) bzw. G13-15 (LMW-GUEs oder Gliadine), 4 bzw. 5 h eluiert bei 150 V.....	78
Abb. 37 Lösung von NZ-Membranstücken (Bahn 1 + 2) bzw. Extraktion von NC-Membranstücken (Bahn 3-5) (1 Tag, 42°C) nach Elektrobplot (1 h; 0,8 A / cm ²) von Gelstücken eines 7% T SDS-PAGE-Gels; MemLM...Membran-Lösungsmittel; MemEL...Membran-Extraktionslösung, LPB...leichte Proteinbande.....	79
Abb. 38 SDS-PAGE-Gel, UPOV-Methode 10% T, ohne fixieren. Gelbanden wurden ausgeschnitten und bei -20°C gelagert. Links ist die Nummerierung der Gelbanden dargestellt, wie sie auch in Tab. 24 und im gesamten Kapitel 4.5.3 Verwendung findet.....	80
Abb. 39 SDS-PAGE, Methode Lämmli, von Ovotransferrin a) Gel nach Blotten CBB-gefärbt b) Gel direkt nach SDS-PAGE CBB-gefärbt.....	82
Abb. 40 Skizze der NZ-Membran nach Färbung mit Ponceau S nach dem Elektrobplot des SDS-PAGE-Gels in Abb. 39 a; Ausgeschnittene Membranteile	83
Abb. 41 SDS-PAGE von NZ-Lösungen, die Ovotransferrinbanden enthalten, silbergefärbt. MemLM...Membran-Lösungsmittel, zur Nomenklatur vgl. Abb. 40	84
Abb. 42 MALDI-TOF von Ovotransferrin (oberstes, [M+H] ⁺ und [M+2H] ²⁺) und von Lösungen von NZ-Membranen.....	85
Abb. 43 SDS-PAGE Quervernetzer	85
Abb. 44 EDA-haltige SDS-PAGE von Ovotransferrin und Weizenproteinen; SB...Molekulargewichtsmarker SeeBlue.....	86
Abb. 45 CGE-am-Chip von Extrakten aus EDA-hältigem SDS-PAGE-Gel; ExL...Gelbanden-Extraktionslösung	87
Abb. 46 Extraktion der Proteinbanden aus EDA-hältigem Gel – Ausschnitt aus Abb. 44; ExL...Gelbanden-Extraktionslösung	88
Abb. 47 MALDI-TOF von Proteinextrakten aus EDA-hältigem SDS-PAGE-Gel nach Proteinchipprobenvorbereitung; ExL...Gelbanden-Extraktionslösung.....	89
Abb. 48 CGE-am-Chip, Methode B, von Extrakten aus EDA-hältigen SDS-PAGE-Gelen; ExL...Gelbanden-Extraktionslösung	90
Abb. 49 (a): NZ-Membran, auf die Proteine aus EDA-hältige SDS-PAGE-Gelstücken geblottet wurden; (b): entsprechende Gelstücke nach dem Blotten; SB...Molekulargewichtsmarker SeeBlue	91
Abb. 50 MALDI-TOF Massenspektren von Ovotransferrin unter An- und Abwesenheit von LDS und nach Aufreinigungsprozedur am Ziptip; ExL...Gelbanden-Extraktionslösung.....	92
Abb. 51 Ausgeschnittene Banden aus EDA-haltigem SDS-PAGE-Gels zwecks Elektroelution.....	93

Abb. 52 CGE-am-Chip von Eluaten aus EDA-haltigen SDS-PAGE-Gelbanden; Ovo...Ovotransferrin.....	94
Abb. 53 Zweistufige Extraktion von Weizen (Capo) – 12 versch. Extraktionsbedingungen gemäß Tab. 6	96
Abb. 54 Zwischenstufen der zweistufigen Extraktion sowie zwei Beispiele für einstufig extrahierte Weizenkörner (Capo)	97
Abb. 55 Dendrogramm einer hierarchischen Clusteranalyse. Die dargestellten Symbole zeigen die HMW-GUE der jeweiligen Weizensorten.....	98
Abb. 56 PCA – Überblick.....	99
Abb. 57 PCA Scores (Hauptkomponente 1 gegen Hauptkomponente 2 aufgetragen).....	100
Abb. 58 PCA Loadings (Hauptkomponente 1 gegen Hauptkomponente 2 aufgetragen).....	101

7.3.BILDNACHWEIS

Abb1:

Figure 1 aus Bousse, L. et al. (2001) „ Protein Sizing on a Microchip“ Analytical Chemistry 73: 1207-1212

Reprinted with permission from Bousse, L. et al. (2001) „ Protein Sizing on a Microchip“ Analytical Chemistry 73: 1207-1212. Copyright 2001 American Chemical Society.

Abb27:

Figure 4 aus s. Uthayakumaran et al. (2006) “Rapid identification and quantitation of high-molecular-weight glutenin subunits” Journal of Cereal Science 44: 34-39

Reprinted from Journal of Cereal Science, Vol. 44, S. Uthayakumaran, Y. Listiohadi, M. Baratta, I.L. Batey, C.W. Wrigley, “Rapid identification and quantitation of high-molecular-weight glutenin subunits”, Pages 34-39, Copyright 2006, with permission from Elsevier.

7.4. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Planare Gelelektrophorese Trenngele 7 %T und 10,3 %T (Methode UPOV) – alle Prozentangaben (w/v).....	20
Tab. 2 Planare Gelelektrophorese Sammelgel (UPOV) – alle Prozentangaben (w/v).....	20
Tab. 3 Planare Gelelektrophorese (Methode Lämmli) - alle Prozentangaben (w/v)	20
Tab. 4 Planare Gelelektrophorese (Methode EDA) - alle Prozentangaben (w/v).....	21
Tab. 5 Die untersuchten Weizensorten mit ihren Gluteninuntereinheiten. Die Sorte.....	26
Tab. 6 Verschiedene Extraktionsbedingungen bei der zweistufigen Extraktion	28
Tab. 7 Intra- und Interchipreproduzierbarkeit von Weizen auf CGE-am-Chip dreier ausgewählter Signale.....	50
Tab. 8 Aus der Migrationszeit abgeleitete Molekülgrößen in kDa der Probe 02 (Capo) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe von 5 ausgewählten Messsignalen. Der %CV dieser Messungen bei verschiedenen Lagerzeiten wird mit dem %CV der Interchipreproduzierbarkeit (4.4.1) für das entsprechende Messsignal gegenübergestellt.	54
Tab. 9 Tabelle der zeitkorrigierten Flächen von 5 ausgewählten Messsignalen der Probe 13 (Vitus) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe. Der %CV dieser Messungen bei verschiedenen Lagerzeiten wird mit dem %CV der Interchipreproduzierbarkeit (4.4.1) für das entsprechende Messsignal gegenübergestellt.	54
Tab. 10 Aus der Migrationszeit abgeleitete Molekülgrößen in kDa der Probe 13 (Vitus) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe von 7 ausgewählten Messsignalen. Der %CV dieser Messungen bei verschiedenen Lagerzeiten wird mit dem %CV der Interchipreproduzierbarkeit (4.4.1) für das entsprechende Messsignal gegenübergestellt.	55
Tab. 11 Tabelle der zeitkorrigierten Flächen von 7 ausgewählten Messsignalen der Probe 13 (Vitus) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe. Der %CV dieser Messungen bei verschiedenen Lagerzeiten wird mit dem %CV der Interchipreproduzierbarkeit (4.4.1) für das entsprechende Messsignal gegenübergestellt.	56
Tab. 12 Aus der Migrationszeit abgeleitete Molekülgrößen in kDa der Probe 30 (Mulan) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe. Von 7 ausgewählten Messsignalen wird der %CV des Messsignals bei verschiedenen Lagerzeiten errechnet	57
Tab. 13 Tabelle der zeitkorrigierten Flächen von 7 ausgewählten Messsignalen der Probe 30 (Mulan) nach 2, 4 und 8 Wochen Lagerung bei 4°C sowie der bei -20°C gelagerten Probe.	

Von 7 ausgewählten Messsignalen wird der %CV des Messsignals bei verschiedenen Lagerzeiten errechnet	57
Tab. 14 Aus der Migrationszeit abgeleitete Molekülgrößen in kDa der Probe 02 (Capo) nach den drei Frier-Auftau-Zyklen von 5 ausgewählten Messsignalen. Der %CV dieser Messungen bei verschiedenen Lagerbedingungen wird mit dem %CV der Interchipseproduzierbarkeit (4.4.1) für das entsprechende Messsignal gegenübergestellt.	61
Tab. 15 Tabelle der zeitkorrigierten Flächen von 7 ausgewählten Messsignalen der Probe 02 (Capo) nach den drei Frier-Auftau-Zyklen. Der %CV dieser Messungen bei verschiedenen Lagerbedingungen wird mit dem %CV der Interchipseproduzierbarkeit (4.4.1) für das entsprechende Messsignal gegenübergestellt.	61
Tab. 16 Aus der Migrationszeit abgeleitete Molekülgrößen in kDa der Probe 13 (Vitus) nach den drei Frier-Auftau-Zyklen von 7 ausgewählten Messsignalen. Der %CV dieser Messungen bei verschiedenen Lagerbedingungen wird mit dem %CV der Interchipseproduzierbarkeit (4.4.1) für das entsprechende Messsignal gegenübergestellt.	62
Tab. 17 Tabelle der zeitkorrigierten Flächen von 7 ausgewählten Messsignalen der Probe 13 (Vitus) nach den drei Frier-Auftau-Zyklen. Der %CV dieser Messungen bei verschiedenen Lagerbedingungen wird mit dem %CV der Interchipseproduzierbarkeit (4.4.1) für das entsprechende Messsignal gegenübergestellt.	62
Tab. 18 Aus der Migrationszeit abgeleitete Molekülgrößen in kDa der Probe 30 (Mulan) nach den drei Frier-Auftau-Zyklen .Von 7 ausgewählten Messsignalen wird der %CV des Messsignals bei verschiedenen Lagerbedingungen errechnet.....	64
Tab. 19 Tabelle der zeitkorrigierten Flächen von 7 ausgewählten Messsignalen der Probe 30 (Mulan) nach den drei Frier-Auftau-Zyklen. Von 7 ausgewählten Messsignalen wird der %CV des Messsignals bei verschiedenen Lagerbedingungen errechnet	64
Tab. 20 Intra- und Interchipseproduzierbarkeit der Weizensorte Capo (Probe 02)	66
Tab. 21 Intra- und Interchipseproduzierbarkeit der Weizensorte Vitus (Probe 13)	66
Tab. 22 Intra- und Interchipseproduzierbarkeit der Weizensorte Alora (Probe 30).....	66
Tab. 23 Vergleich der Molekulargewichtszuweisung von Gluteninuntereinheiten mittels SDS-PAGE und CGE-am-Chip.....	73
Tab. 24 Ausgeschnittene Proteinbanden aus SDS-PAGE-Gel in Abb. 38.....	81
Tab. 25 Gegenüberstellung der Bandenbezeichnung in Abb. 38.....	81
Tab. 26 Molekulargewichte der HMW-GUE auf CGE-am-Chip, ermittelt durch visuellen Vergleich	102

7.5. ABKÜRZUNGEN

AA-Stammlösung	Acrylamid-Stammlösung
ACN	Acetonitril
AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
APS	Ammoniumpersulfat
Avg	Mittelwert
BisAA-Stammlösung	N,N'-Methylenbisacrylamid-Stammlösung
CBB	Coomassie-Brillant-Blau
CGE	Kapillargelelektrophorese
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Entfärbt
DTT	Dithiothreitol
EDA	Ethylenglycoldiacrylat
EOF	Elektroosmotischer Fluss
EtOH	Ethanol
E-Röhrchen	Elektroelutionsröhrchen
ESI	Elektrosprayionisation
ExL	Gelbanden-Extraktionslösung
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HMW-GUE	High-molecular-weight-Gluteninuntereinheit
kDa	Kilodalton
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LM	Unterer Marker
LMW-GUE	Low molecular weight-Gluteninuntereinheit
LPB	leichte Proteinbande= Bande am Gel, die leichter als GUEs ist
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laserdesorption/Ionisation-Flugzeit-
Massenspektrometer	
MemEL	Membran-Extraktionslösung
MemLM	Membran-Lösungsmittel
MeOH	Methanol
m/z	Masse-zu-Ladungszahlverhältnis
NaOAc	Natriumacetat

NH ₃	Ammoniak
NZ	Nitrozellulose
Ovo	Ovotransferrin
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCA	Hauptkomponentenanalyse
SB	Molekulargewichtsmarker SeeBlue
SEV	Sekundärionenvervielfältiger
SDS	Natriumdodecylsulfat
STD	Standardabweichung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UHQ	auf Simplicity Millipore System aufbereitetes Wasser ($\Omega_m \leq 18 \mu\text{S/cm}$)
UM	Oberer Marker
UPOV	Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen
%CV	Variabilitätskoeffizient (auch Variationskoeffizient genannt)

C U R R I C U L U M V I T A E

Angela Lehner



Persönliche Daten

Konstanziagasse 44/7/7

1220 Wien

angela.lehner@chello.at

Geburtsdatum: 11.04.1983

Familienstand: ledig

Schulbildung 1989 – 1993 Volksschule, Wien

1993 – 2001 Realgymnasium, Wien

2001 Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

Studium Seit 2001 Studium der Chemie an der Universität Wien

Spezialisierungen im 2. Studienabschnitt:

30 Stunden Analytische Chemie

20 Stunden Anorganische Chemie

10 Stunden Biochemie

Kongressteilnahmen

4th Central and Eastern European Proteomics Symposium

August / September 2010

International Metabolomics Austria

September 2010

Berufliche Tätigkeiten

März 2010 – Juli 2010
Tutorin an der TU Wien

Oktober 2009 – Februar 2010
Tutorin an der TU Wien

März 2006 – September 2009:

Projektmitarbeiterin an der Uni Wien

Literaturrecherchen und Wartung einer NMR-Datenbank

Vorherige Tätigkeiten:

MM – Promotion, Teilzeitbeschäftigung

Merkur, Ferialjob

Sonstiges

Ehrenamtliches Engagement im kirchlichen Jugendbereich, unter anderem
Organisation von internationalen Jugendtreffen,

Seit 2007 Pfarrgemeinderat