

1. Direkte fotometrische Bestimmung im UV-Bereich

1.1 Füllen Sie den Lückentext durch Schlussfolgerungen, die man aus den beiden Abbildungen ziehen kann.

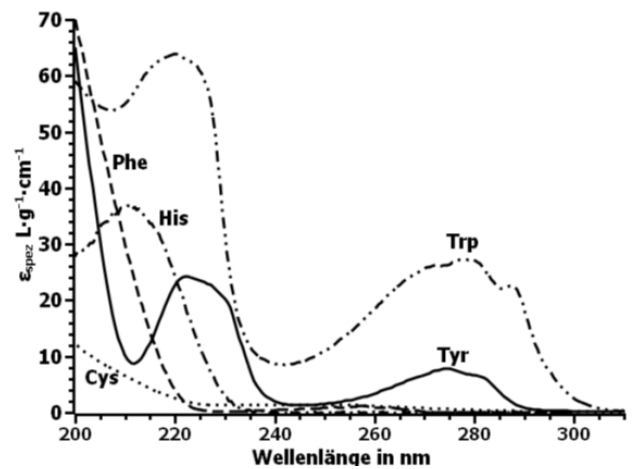
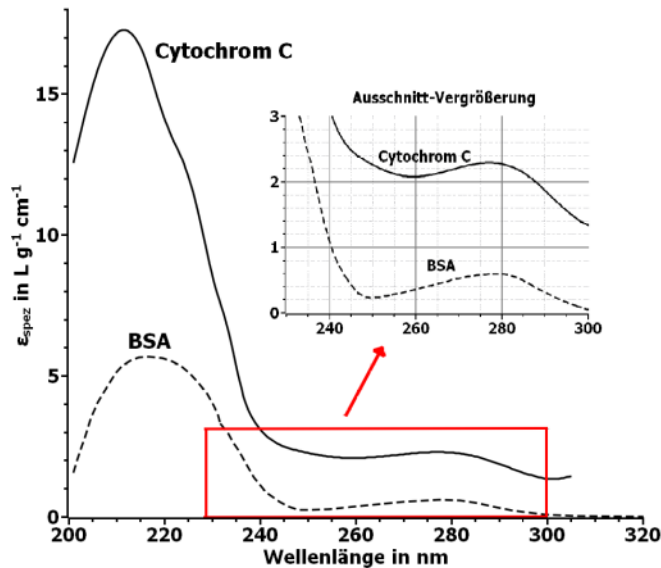


Abb. 1.1: Zwei Bsp. für UV-Spektren von Proteinen, BSA: Bovines Serumalbumin

Abb. 1.2: UV-Spektren einiger Aminosäuren

Die fotometrische Bestimmung von Proteinen kann auch ohne Reagenzienzugabe direkt im UV-Bereich erfolgen: Sie wird meist bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  durchgeführt, manchmal auch bei  $\lambda = 205 \text{ nm}$ .

Für die Absorbanz bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  sind fast ausschließlich die aromatischen Aminosäuren ..... und ..... verantwortlich. Die anderen beiden aromatischen Aminosäuren (..... und .....) absorbieren hier kaum. Die Absorptionskoeffizienten der einzelnen Proteine unterscheiden sich regelmäßig um bis zu Faktor 5! Je höher der Anteil an ..... und ..... in der Primärstruktur, desto höher ist  $\epsilon$ . Beispiele:  $\epsilon_{\text{spez}}(\text{BSA}) = 0,67 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{\text{spez}}(\text{Streptavidin}) = 3,4 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

1.1 Berechnen Sie mithilfe der Datenbank [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) die Prozentanteil an Trp+Tyr an der Gesamtzahl der AS. Ergebnisse: BSA: ..... von ..... AS  $\Rightarrow$  .....% Streptavidin: ..... von ..... AS  $\Rightarrow$  %

Ist das untersuchte Protein(gemisch) nicht näher bekannt nimmt man aus Verlegenheit häufig den Wert von  $1,00 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  oder den von BSA mit  $0,67 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (als Quasistandard/Referenzprotein). Der wahre Proteingehalt ist dann nicht bekannt und kann mehr als Faktor 5 von dem berechneten Schätzer abweichen.

Die hohe Absorption bei  $200 - 220 \text{ nm}$  beruht auf der Peptidbindung und zahlreicher aromatischer und nichtaromatischer Seitenketten, (z.B. ...., siehe Abb. 1.2), einzelner Aminosäuren. Dieser Wellenlängenbereich wird trotz der deutlichen höheren Absorptionskoeffizienten (häufig genutzter Mittelwert:  $\epsilon = 31 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) und der damit einhergehenden höheren Sensitivität, nur dann genutzt, wenn im Protein kaum Trp/Tyr-Anteile enthalten sind. Gegen eine Messung bei  $205 \text{ nm}$  spricht, dass hier das Spektrum eine steile Flanke besitzt und keinen Plateau-Bereich. Geringe Ungenauigkeiten in der Einstellung der Wellenlänge durch das Gerät oder  $\lambda_{\text{max}}$ -Verschiebungen aufgrund kleiner Veränderungen der Lösung (z.B. pH) können zu großen Abweichungen führen.

Außerdem sind UV-Kunststoffküvetten hier meist nicht geeignet, da selbst dieser Spezialkunststoff so viel Strahlung absorbiert, dass die Restlichtintensität trotz Kompensation mittels einer Leerwert-Messung („blank“), zu ungenauen Ergebnissen führt. Bei Kleinstvolumen-Fotometer, die ohne Küvette arbeiten, fällt dieser Nachteil weg.

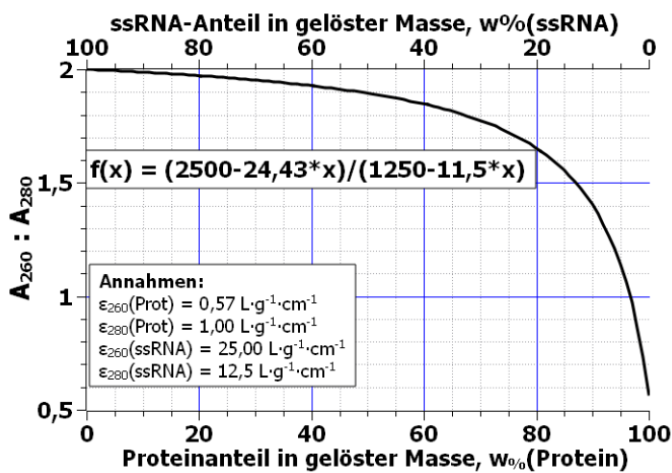
Der größte Nachteil bei allen Bestimmungen im UV-Bereich ist, dass zahlreiche andere Stoffe auch bei 280 nm absorbieren. Hierzu gehören viele häufig verwendete Hilfsstoffe, insbesondere solche mit aromatischen Bestandteilen. Immerhin versucht man deshalb auf Puffer mit aromatischen Komponenten zu verzichten (vgl. [GOOD-Puffer](#), im 2. Lehrjahr behandelt!). Neben Puffern stören auch die natürlicherweise vorkommenden Nucleinsäuren (RNA und DNA), die UV-Proteingehaltsbestimmung, schließlich enthalten sie ja auch aromatische Nucleinbasen.

Die Proteinspektren zeigen im Bereich von  $\lambda \approx 260$  nm eine kleine Eindellung, ein lokales Minimum (vgl. [Abb. 1.1](#)). Auf der anderen Seite absorbieren in diesem Bereich Nucleinsäuren (DNA und RNA) besonders stark.

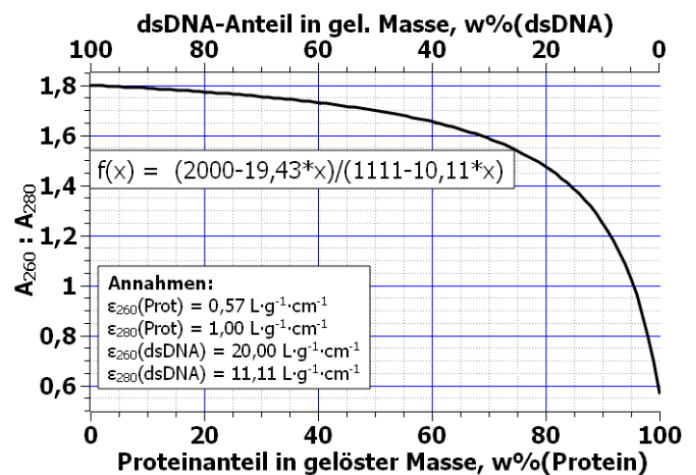
### 1.2 Vervollständigen Sie folgende Tabelle

	$\epsilon_{\text{spez}(260)}$ in $\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	Massenkonzentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$ (= $\text{mg}/\text{L}$ ), die zu $A_{260} \approx 1$ führt (bei $d = 1$ cm)
(ssRNA)	25	40
Doppelstrang-DNA (dsDNA)	20	
Einzelstrang-DNA (ssDNA)		33

Das kann man nutzen um die Reinheit von isolierten Proteinen grob abzuschätzen, d.h. die Verunreinigung mit Nucleinsäuren abzuschätzen. **Umgekehrt gilt das nicht: Man kann die Verunreinigung eines Nucleinsäure-Präparats mit Proteinen nicht durch das  $A_{260} : A_{280}$ -Verhältnis abschätzen!** [Leider sehr häufig missachtet!]



**Abb. 1.3:** Kurve zum Abschätzen der Verunreinigung eines Protein-Präparats durch ssRNA (Annahme: Reine RNA:  $A_{260}:A_{280} \approx 2,0$ )



**Abb. 1.4:** Kurve zum Abschätzen der Verunreinigung eines Protein-Präparats durch dsDNA (Annahme: Reine dsDNA:  $A_{260}:A_{280} \approx 1,8$ )

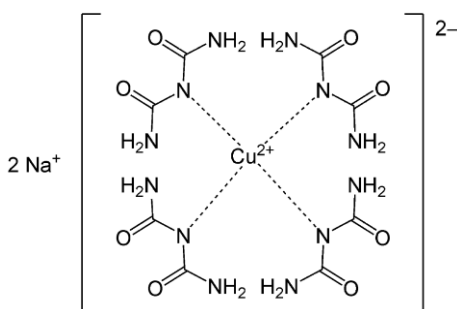
**1.3a)** Eine Proteinprobe enthält etwas dsDNA als Verunreinigung. Der Quotient  $A_{260}:A_{280}$  beträgt 1,0. Geben Sie die grobe Zusammensetzung  $w(\text{Prot})$  und  $w(\text{dsDNA})$  an. Warum handelt es sich nur um eine Schätzung, wobei der Anteil der dsDNA-Verunreinigung deutlich abweichen kann?

**1.3b)** Ein Proteinpräparat ist mit  $w(\text{ssRNA}) = 3\%$  verunreinigt. Welchen Quotient  $A_{260}:A_{280}$  erwarten Sie? Bei einem anderen Proteinpräparat ist die RNA-Verunreinigung zehn mal größer, also  $w(\text{ssRNA}) = 30\%$ . Welchen Quotient erwarten Sie dann?

**1.3c)** Ein RNA-Präparat besitzt ist mit  $w(\text{Prot}) = 3\%$  verunreinigt. Welchen Quotient  $A_{260}:A_{280}$  erwarten Sie? Bei einem anderen RNA-Präparat ist die Protein-Verunreinigung zehn mal größer, also  $w(\text{Prot}) = 30\%$ . Welchen Quotient erwarten Sie dann? Weshalb ist die Methode hier nicht zur Abschätzung der Proteinverunreinigungen geeignet?

**1.4** Ein(e) Laborant(in) freut sich nach einer RNA-Isolierung, weil der  $A_{260}:A_{280}$ -Quotient 1,97 beträgt und damit nahe dem theoretischen Wert von 2,0 liegt. Was entgegnet Sie ihm/ihr?

## 2. Biuret-Reaktion



Die **Biuretreaktion** bezeichnet die Komplexbildung zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und Peptidbindungen, wie sie in Biuret oder in Proteinen vorkommen. Der Komplex hat eine tiefblaue Farbe. Die Tatsache, dass die Komplexbildung mithilfe der Peptidbindungen und nicht mit AS-Resten erfolgt bringt einen Vorteil mit sich:

**Abb. 2.1:** Komplex zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und Biuret

Das  $\text{Cu}^{2+}$ -haltige Farbreagenz lässt sich leicht selbst herstellen, kann aber auch fertig gekauft werden.

**Fotometrische Daten:** Messung bei  $\lambda_{\text{max}} \approx 545 \text{ nm}$ . Untere Nachweisgrenze: 1 mg/L.

## 3. Ableger der Biuretreaktion: Empfindlicher, teurer, störanfälliger

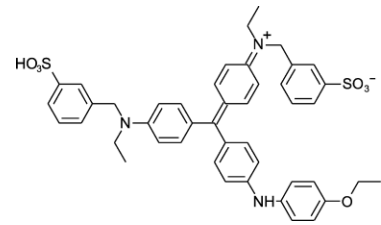
Der Komplex zwischen dem  $\text{Cu}^{2+}$  und den Peptidbindungen ist nicht sehr stabil, denn einige reduzierend wirkende Aminosäurereste und die Peptidbindung selbst sorgen allmählich für die Reduktion:  $\text{Cu}^{2+} + e^- \rightarrow \text{Cu}^+$ . Diese Reaktion kann jedoch auch analytisch genutzt werden, da  $\text{Cu}^+$  mit manchen organischen Verbindungen intensiv gefärbte Farbstoffe ergibt.

**LOWRY-Methode:** Das bei der Biuretreaktion allmählich entstehende  $\text{Cu}^+$  wandelt das im Reaktionsgemisch vorhandene **Folin-Ciocalteau-Reagenz** in einen instabilen, aber sehr intensiven blauen Farbstoff um. Die hohe Empfindlichkeit im Bereich von Mikrogramm pro Milliliter erkaufte man sich jedoch mit einer hohen Störanfälligkeit. Viele häufig genutzte biochemische Puffer sowie andere Stoffe verfälschen das Ergebnis. **Fotometrische Daten:**  $\lambda$  (mehrere geeignet!): 545 nm, 650 nm, 750 nm. Untere Nachweisgrenze:  $\beta = 0,1 \text{ mg/L}$

**BCA-Methode:** Statt mit Folin-Ciocalteau-Reagenz wird **Bicinchoninsäure (BCA)** der Reagenzlösung zugesetzt, die mit  $\text{Cu}^+$  einen intensiven violetten Komplex ergibt. Auch hier gelten im Prinzip die Vor- und Nachteile der Lowry-Methode, wobei der Test jedoch etwas einfacher und kürzer durchgeführt werden kann. **Fotometrische Daten:** Messung bei  $\lambda_{\text{max}} \approx 562 \text{ nm}$ . Untere Nachweisgrenze:  $\beta = 0,5 \text{ mg/L}$ .

#### 4. Bradford-Test

**Coomassie-Brillant-Blau G250**, häufig nur als **Coomassie** bezeichnet, ist ein Farbstoff, der zum Anfärben von Proteinen verwendet wird. Er lagert sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an und färbt damit Proteine an. Der Name des ursprünglich Wollfarbstoffes leitet sich von **Kumasi** ab, der zweitgrößten Stadt in Ghana.



**Abb. 2:** Strukturformel von Coomassie

**BRADFORD-Test** : Durch Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm. Da der Absorptionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes außerdem sehr viel höher als der des freien Farbstoffes ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreaenz fotometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

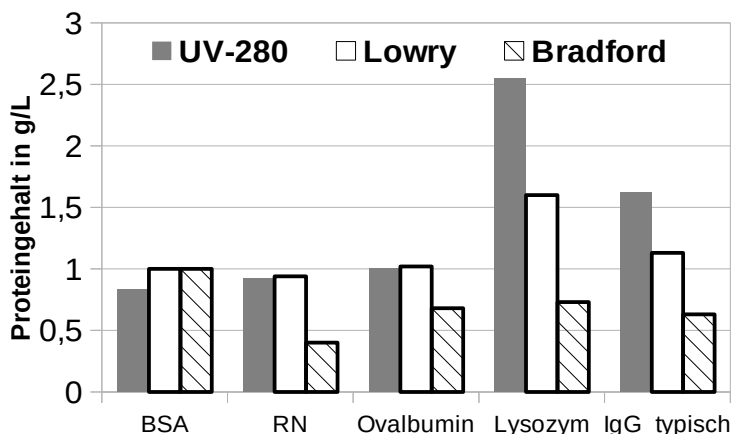
Das Ausmaß der Farbreaktion ist von Protein zu Protein verschieden: Je nach Zusammensetzung des Proteingemisches erhält man trotz gleichen Gesamtproteingehalts unterschiedliche Ergebnisse. Der Test ist nur semi-quantitativ. Dies ist die Hauptschwäche der BRADFORD-Bestimmung. Ihre Vorteile sind ihre hohe Sensitivität und die einfache und schnelle Durchführung.

**Fotometrische Daten:** Messung bei  $\lambda_{\max} \approx 595$  nm. Untere Nachweisgrenze (Mikrotest):  $\beta = 1$  mg/L

Ein ähnlicher Farbstoff (aber nicht derselbe!), nämlich **Coomassie Brilliant Blue R250**, wird häufig auch zum unspezifischen Anfärben von Proteinbanden nach der elektrophoretischen Auftrennung benutzt.

#### 6. Die Genauigkeit aller Proteinbestimmungsmethoden darf nicht überschätzt werden!

Bei jeder der Proteinbestimmungsmethoden wird mit Kalibrierlösungen zuerst eine Kalibrierkurve erstellt. Eigentlich sollte als Kalibriersubstanz genau das Protein benutzt werden, was in auch in der unbekanntem Proteinprobelösung enthalten ist. Wenn dieses nicht gereinigt zur Verfügung steht oder wenn der Gesamtproteingehalt von sehr komplexen und in der Zusammensetzung unbekanntem Proteingemischen, beispielsweise von Zellextrakten, bestimmt werden soll werden, muss für die Kalibrierung ersatzweise ein Referenzprotein, meist **bovines Serumalbumin (BSA)**, eingesetzt werden. Bei der graphischen Bestimmung wird also so getan, als ob die unbekannte Probe das Protein ausschließlich als BSA enthält. In Wirklichkeit wird also nicht der wahre Proteingehalt bestimmt, sondern nur **Albumin-Äquivalente**. Der wahre Gehalt an Protein kann von diesem Albumin-Äquivalent-Gehalt deutlich abweichen. Besonders ungenau wird es, wenn an der Farbreaktion/Absorption nicht die Peptidbindungen, sondern die Aminosäureseitenketten beteiligt sind, also bei der Schnellmethode im UV-Bereich. Die unterschiedlichen Methoden liefern für ein und dieselbe Probe somit unterschiedliche Gesamtproteingehalte. *Diskutieren unten stehende Abbildung.*



**Abb. 6.1:** Vergleich verschiedener quantitativer Proteinbestimmungsmethoden beim Einsatz gleicher Massenkonzentrationen verschiedener Proteine. Alle Proteinlösungen besitzen einen tatsächlichen Gehalt von  $\beta(\text{Protein}) = 1$  g/L. Bei der Bestimmung nach der LOWRY- und der BRADFORD-Methode wurde eine Kalibrierung mit BSA durchgeführt. Bei der Bestimmung mit der UV-Methode diente Ovalbumin als Kalibriersubstanz.

6.1 Interpretieren Sie das Diagramm vollständig