

1. Direkte fotometrische Bestimmung im UV-Bereich

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

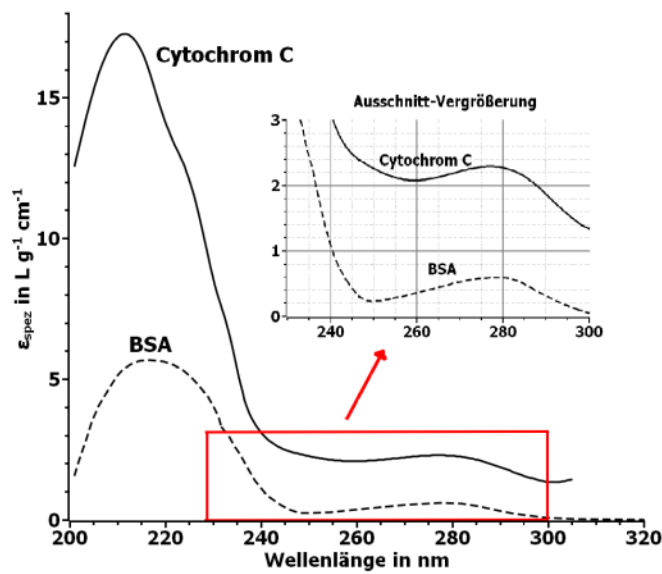


Abb. 1.1: Zwei Bsp. für UV-Spektren von Proteinen, BSA = Bovines Serumalbumin (Quelle: eigenes Werk)

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 ϵ . 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 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 stellvertretend häufig einen 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* an. Der wahre Proteingehalt kann damit natürlich nicht berechnet werden und kann sich mehr als um Faktor 5 (!) von dem berechneten Schätzer unterscheiden. Nimmt man aber an, dass zwei Proben dieselbe Proteinzusammensetzung haben, so lassen sich damit jedoch die beiden Ergebnisse untereinander vergleichen, auch wenn der absolute Gehalt nicht stimmt.

Die hohe Absorption bei 200 - 220 nm beruht auf der Peptidbindung und zahlreicher aromatischer und nichtaromatischer AS-Seitenketten, (z.B. die des nichtaromatischen, siehe Abb. 1.2). 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 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 λ_{max} -Verschiebungen aufgrund kleiner Veränderungen der Lösung (z.B. pH) können zu großen Abweichungen führen. Außerdem sind UV-Kunststoffküvetten hier nicht geeignet, da selbst dieser Spezialkunststoff hier 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.

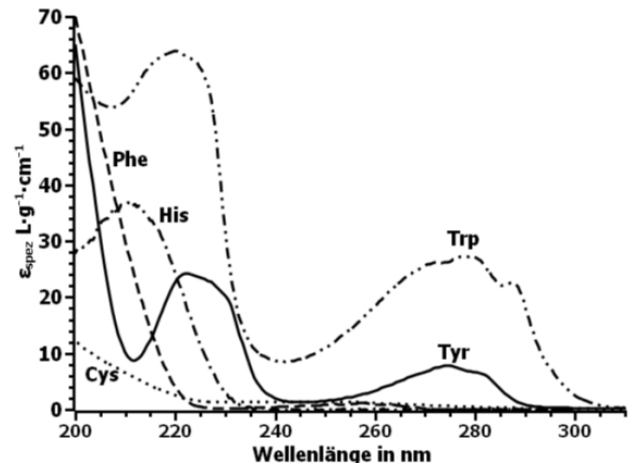


Abb. 1.2: UV-Spektren einiger Aminosäuren (Quelle: eigenes Werk)

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](#)). Neben Puffern stören auch RNA und DNA die UV-Proteingehaltsbestimmung, schließlich enthalten sie ja auch aromatische Nucleinbasen.

Schätzung des Proteingehalts bei Verunreinigung durch DNA/RNA

Viele Proteinspektren zeigen im Bereich von $\lambda \approx 260$ nm eine kleine Eindellung, ein lokales Minimum (vgl. z.B. *Cytochrom c*, Abb. 1.1). Auf der anderen Seite absorbieren in diesem Bereich Nucleinsäuren (DNA und RNA) besonders stark, wie aus der folgenden Tabelle zu entnehmen ist:

1.2 Vervollständigen Sie folgende Tabelle durch Berechnung.

	$\epsilon_{\text{spez}(260)}$ in $\text{L}\cdot\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$	Massenkonzentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$ (= mg/L), die zu $A_{260} \approx 1$ führt (bei $d = 1$ cm)
Einzelstrang-RNA (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. Hierzu muss man man die Absorbanzen bei 260 nm und bei 280 messen, und dann den Quotienten berechnen.

Umgekehrt gilt das nicht: Man kann die Verunreinigung eines Nucleinsäure-Präparats mit Proteinen nicht durch das $A_{260} : A_{280}$ -Quotient abschätzen! [Grund: siehe Aufgabe 1.3b unten! Leider sehr häufig missachtet!]

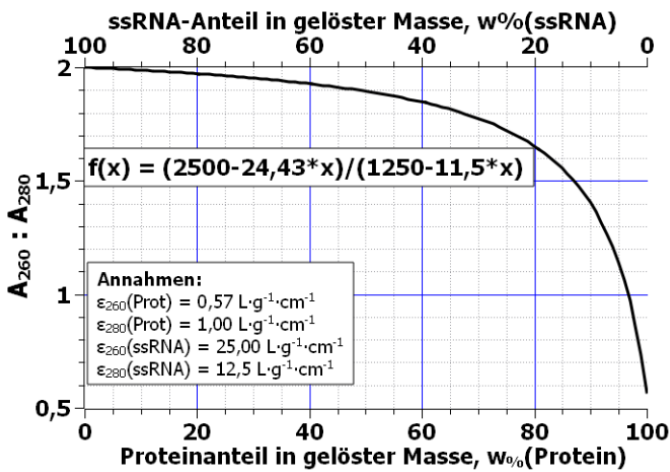


Abb. 1.3: Kurve zum Abschätzen der Verunreinigung eines Protein-Präparats durch ssRNA (Annahme: Reine RNA: $A_{260}:A_{280} \approx 2,0$)

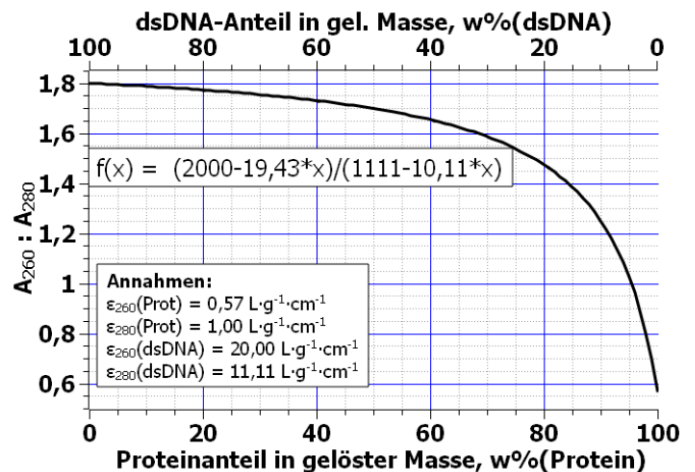


Abb. 1.4: Kurve zum Abschätzen der Verunreinigung eines Protein-Präparats durch dsDNA (Annahme: Reine dsDNA: $A_{260}:A_{280} \approx 1,8$)

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?

.....
.....

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

.....

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

1.4 Ein Laborant freut sich nach einer RNA-Isolierung, weil der A260:A280-Quotient 1,97 beträgt und damit nahe dem theoretischen Wert von 2,0 liegt. Was entgegnet Sie ihm?

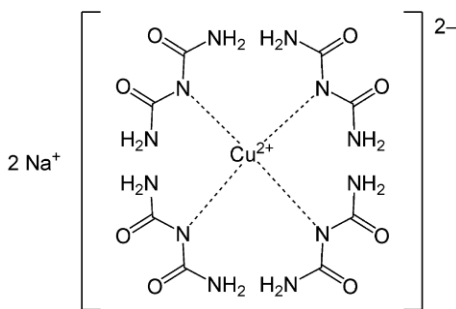
.....

.....

.....

.....

2. Biuret-Reaktion



Die **Biuretreaktion** bezeichnet die Komplexbildung zwischen 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 Cu^{2+} und Biuret

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

LOWRY-Methode: Das bei der Biuretreaktion allmählich entstehende Cu^+ wandelt das im Reaktionsgemisch vorhandene **Folin-Ciocalteu-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:** λ (mehrere geeignet!): 545 nm, 650 nm, 750 nm. Untere Nachweisgrenze: $\beta = 0,1 \text{ mg/L}$

BCA-Methode: Statt mit Folin-Ciocalteu-Reagenz wird **Bicinchoninsäure (BCA)** der Reagenzlösung zugesetzt, die mit 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.

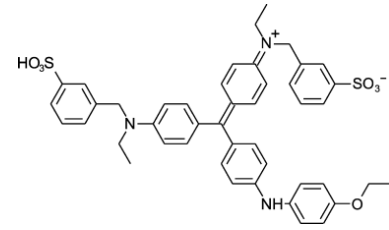


Abb. 2: Strukturformel von Coomassie

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 Farbreagenz 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.*

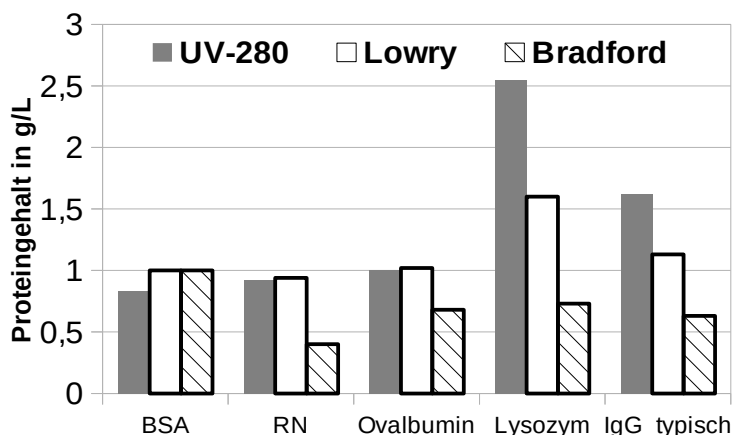


Abb. 6.1: Vergleich verschiedener quantitativer Proteinbestimmungsmethoden beim Einsatz gleicher Massenkonzentrationen verschiedener Proteine. Alle Proteinlösungen besitzen einen tatsächlichen Gehalt von $\beta(\text{Protein}) = 1$ g/L. Bei der Bestimmung nach der LOWRY- und der BRADFORD-Methode wurde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

6.1 Interpretieren Sie das Diagramm vollständig