

Proteinbestimmung

Diese Lerneinheit befasst sich mit der Beschreibung von verschiedenen Methoden der Proteinbestimmung mit den folgenden Lehrzielen:

- Verständnis der Prinzipien der Proteinbestimmung sowie deren praktischer Durchführung
- Unterscheidung zwischen qualitativen und quantitativen Proteinbestimmungen

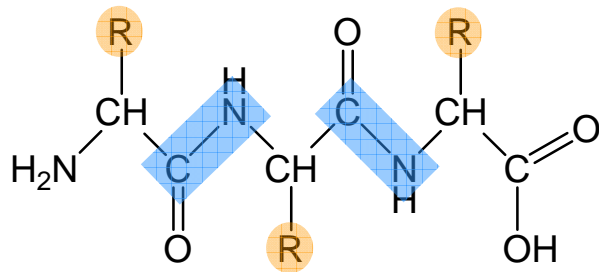
Qualitative und quantitative Methoden

- Die einfachste Art der Proteinbestimmung ist die quantitative. Das bedeutet man misst, wie viel Protein in einer Probe enthalten ist.
- Davon zu unterscheiden sind qualitative Methoden:
 - *Bestimmung, welches Protein vorhanden ist*
 - *Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung eines bestimmten Proteins*
 - *Molekulargewichtsbestimmung*
 - *Sonstige Charakterisierung eines Proteins*
- Im Weiteren ist nur mehr von quantitativen Methoden die Rede.

Proteine allgemein

- Proteine sind sehr unterschiedliche Polymere, die aus Aminosäuren aufgebaut sind.
- Es gibt 20 Aminosäuren, die zum Aufbau von Proteinen herangezogen werden.
- Die einzelnen Proteine unterscheiden sich durch die Anzahl und Sequenz der Aminosäuren.

Proteine allgemein



- Gezeigt ist die allgemeine Formel eines Tripeptids.
- R bezeichnet die Seitenketten der Aminosäuren.
- Die Bindung, die zwischen der Aminogruppe der einen und der Carboxylgruppe der anderen Aminosäure ausgebildet wird, heißt Peptidbindung.

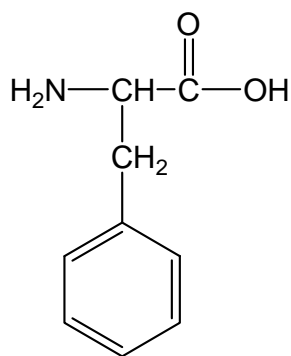
Proteinbestimmungen

Folgende Methoden werden im Zuge dieser Präsentation erläutert:

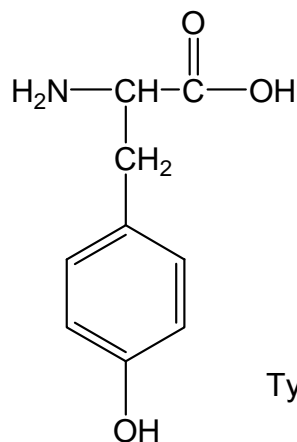
- UV-Absorption
- Biuret-Methode
- Methode nach Lowry
- BCA-Methode
- Methode nach Bradford

UV-Absorption

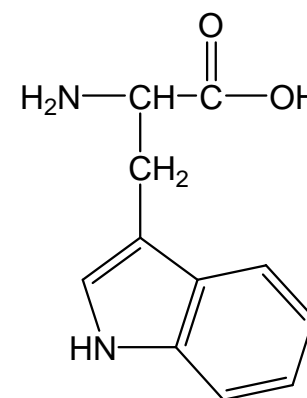
- Eine der einfachsten Methoden, eine Substanz zu quantifizieren, ist ihre Eigenabsorption zu messen.
- Proteine sind nicht gefärbt, aber durch den Gehalt an aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan besitzen sie eine Absorption im UV-Bereich (280 nm).



Phenylalanin



Tyrosin



Tryptophan

UV-Absorption

- Diese Methode besitzt jedoch eine sehr eingeschränkte Anwendbarkeit.
- Die Lösungen müssen klar und „sauber“ sein.
- Stoffe, die selbst eine Absorption bei 280 nm besitzen, stören.
- Proteine, die einen ungewöhnlich hohen oder niedrigen Wert an aromatischen Aminosäuren aufweisen, liefern abweichende Werte.
- Für eine Proteinbestimmung aus Serum oder Plasma ist diese Methode nicht geeignet.

Biuret-Methode

- Diese schon lange bekannte Methode beruht darauf, dass Cu^{2+} -Ionen von Peptidbindungen komplexiert werden (Bildung von Komplexen siehe „Grundlagen der physiologischen Chemie I, Chemische Bindung“, Modul 01).
- Es sind mindestens 2 Peptidbindungen (also mindestens ein Tripeptid) für die Komplexbildung erforderlich.
- Der Komplex weist eine Färbung auf, die bei einer Wellenlänge von 540 nm fotometrisch gemessen werden kann.
- Die Farbintensität ist proportional der Anzahl der Peptidbindungen und damit der Proteinkonzentration.

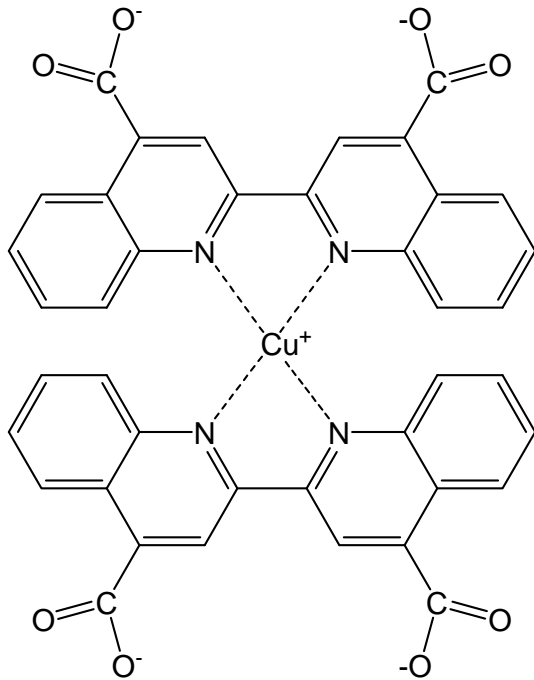
Lowry-Methode

- Die Anfang der 50er Jahre publizierte Methode beruht einerseits auf der Komplexierung von Kupferionen wie in der Biuret-Methode, sowie einer anschließenden Reaktion .
- Bei dieser Reaktion wird ein weiteres Reagens (Folin-Reagens), das Molybdat und Wolframat enthält, vom Protein-Kupferkomplex reduziert, wodurch es eine Farbänderung von gelb nach blau erfährt.
- Manche Aminosäuren, wie Tyrosin, Tryptophan oder Cystein tragen zu dieser Reaktion bei und vermögen das Folin-Reagens auch ohne Komplexbildung zu reduzieren.
- Reduktionsmittel in der Probelösung stören diese Bestimmung.

BCA-Methode

- Diese ist heute eine sehr häufig angewendete Methode und auch hier ist die Komplexbildung mit Cu^{2+} -Ionen von Bedeutung.
- Nach der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch das Protein erfolgt eine Umkomplexierung.
- Aus dem Proteinkomplex entsteht ein Komplex mit dem Reagens „Bicinchoninic Acid“ (gibt der Methode den Namen).

BCA-Methode



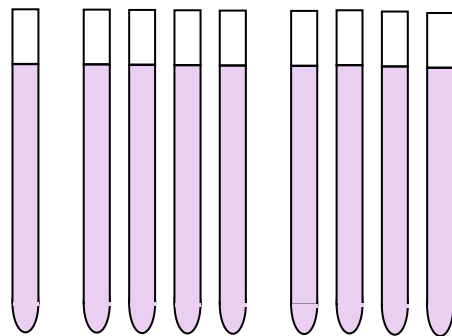
- Die Abbildung zeigt den Kupfer-Komplex der Bicinchoninic Acid.
- Die Stickstoffatome sind für die Komplexbildung verantwortlich.
- Die Carboxylgruppe bewirkt die Wasserlöslichkeit von Reagens sowie Komplex.
- Nachdem bei dieser Methode wiederum eine Reduktionsreaktion beteiligt ist, ist sie empfindlich auf sonstige Reduktionsmittel in der Probelösung.

Bradford-Methode

- Bei dieser Methode ist kein Kupferkomplex im Spiel.
- Sie beruht darauf, dass ein Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue) an Proteine bindet.
- Der Farbstoff kann je nach dem pH-Wert in verschiedenen Formen vorliegen, die unterschiedlich gefärbt sind.
- Beim Binden an das Protein ist die blaue Form am stabilsten.
- Vor allem basische und unpolare Aminosäuren tragen zur Farbstoffbindung bei.
- Den gebildeten Komplex kann man fotometrisch quantifizieren.
- Detergentien verhindern das Binden des Farbstoffes an das Protein und stören die Bestimmung.

Praktische Durchführung

Abgesehen von der UV-Absorption verlaufen die verschiedenen Proteinbestimmungen nach folgendem Schema:

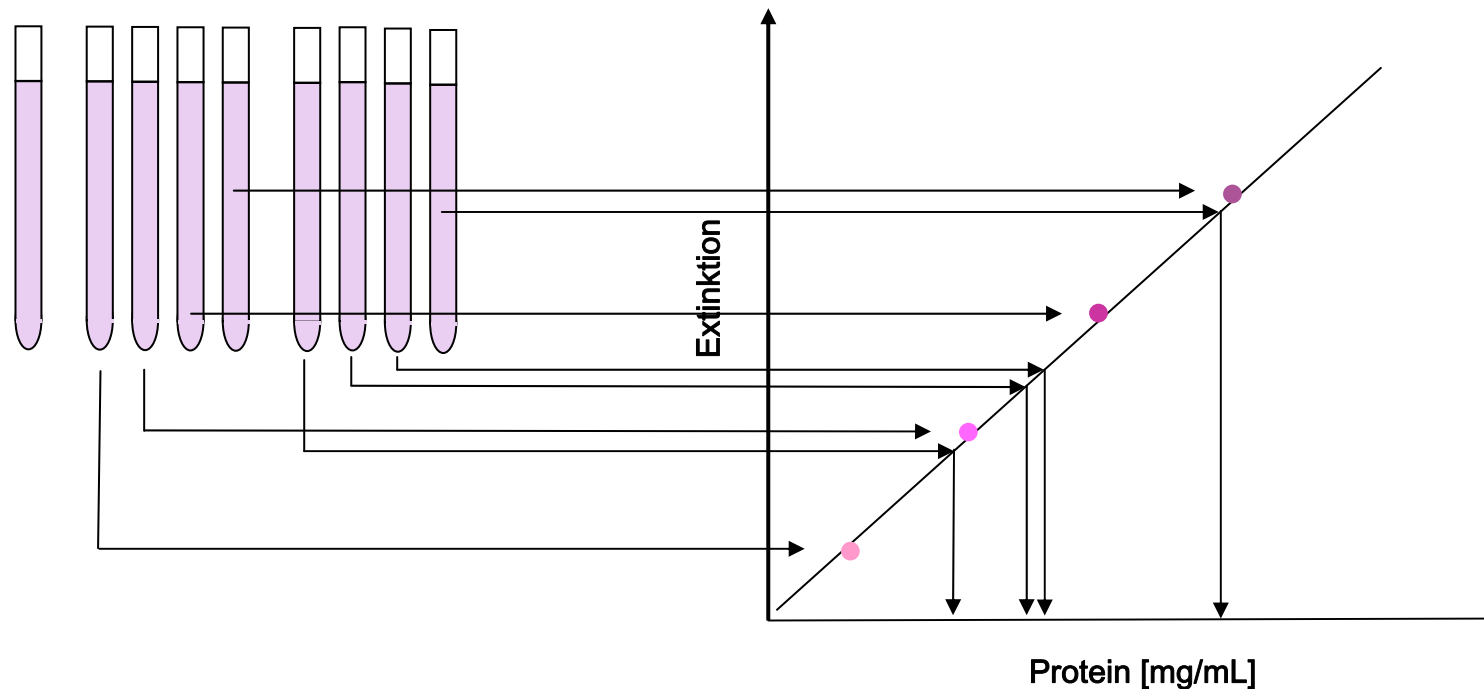


Blank Standards Unbekannte Proben

- In Eprovetten oder kleineren Reaktionsgefäßen werden die Proben mit dem entsprechenden Reagens vermischt.
- Es ist notwendig, einen Reagenzienleerwert (Blank), der kein Protein enthält, sowie mehrere Standard-Proben, die Protein in bekannter Konzentration enthalten, anzusetzen.
- Der Ansatz wird die angegebene Zeit bei der angegebenen Temperatur inkubiert.
- Während der Inkubationszeit tritt die Färbereaktion ein.

Praktische Durchführung

- Nach der Inkubationszeit misst man die Extinktionen der einzelnen Ansätze
- Das Fotometer wird zuvor mit dem Blank auf „0“ gestellt. Auf diese Weise wird der Reagenzienleerwert, das ist die Extinktion, die auf das Reagenzmittel selbst zurückgeht, automatisch von allen Proben abgezogen.
- Mit Hilfe der Standards erstellt man eine Kalibrationsgerade
- Anhand dieser kann man aus den gemessenen Extinktionen der einzelnen Proben deren Proteingehalt berechnen.

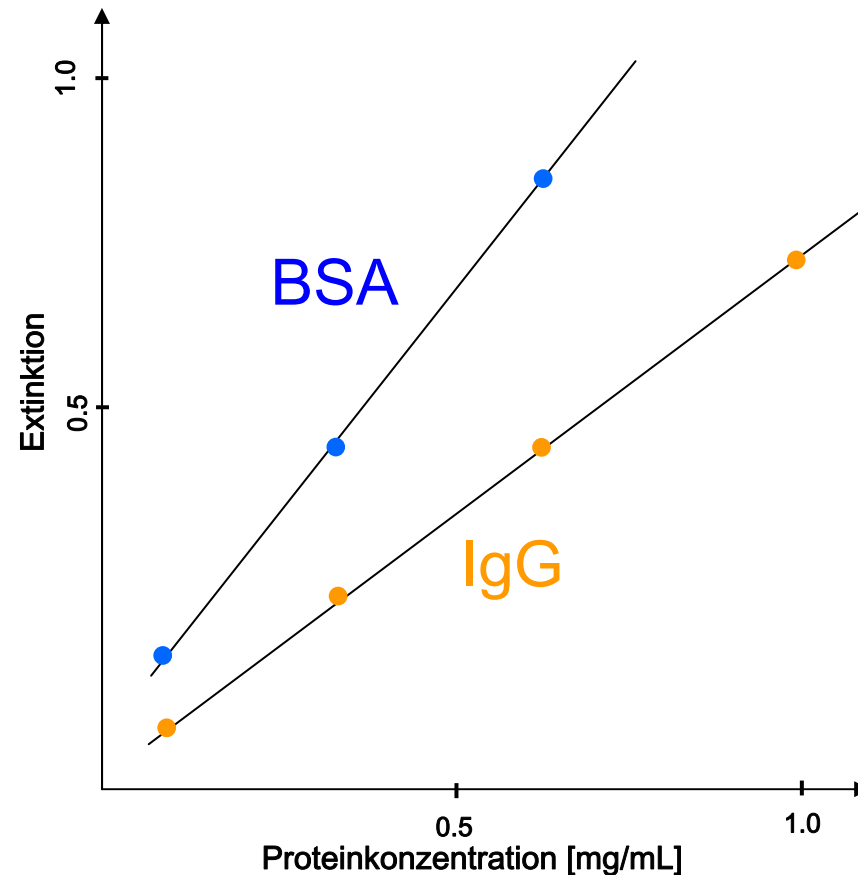


Schwierigkeiten bei der Proteinbestimmung

- Bei biologischen Proben hat man es normalerweise mit Mischungen aus verschiedenen Proteinen zu tun.
- Verschiedene Proteine verhalten sich bei der Quantifizierung unterschiedlich (UV-Absorption hängt vom Gehalt aromatischer Aminosäuren ab, verschiedene Proteine können unterschiedlich gut als Reduktionsmittel wirken, ...).
- Verschiedene Stoffe, die sich neben den Proteinen in der Probelösung befinden, können die Bestimmung stören (Tenside, Reduktionsmittel, ...).
- Welche Stoffe stören, muss vor der Bestimmung abgeklärt und eine entsprechende Methode ausgewählt werden.

Schwierigkeiten bei der Proteinbestimmung

- Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Reaktion von 2 verschiedenen Proteinen bei einer Quantifizierung.
- BSA (Rinderserumalbumin, im Englischen bovine serum albumin) zeigt eine wesentlich höhere Empfindlichkeit als zum Beispiel die Antikörper IgG.



Schwierigkeiten bei der Proteinbestimmung

- Aus den oben erläuterten Umständen ist es erklärlich, dass verschiedene Methoden leicht abweichende Ergebnisse liefern.
- Die Angabe der Bestimmungsmethode ist damit genau genommen erforderlich, um das Ergebnis beurteilen oder reproduzieren zu können.
- Die Messungen sind keine Endpunktmessungen. Das bedeutet, dass die Reaktion nach der Inkubationszeit nicht zum Stillstand kommt.
- Es ist daher unbedingt notwendig, auf die Einhaltung von Reaktionszeiten zu achten.
- Bei dieser Art von Bestimmung muss man sich überlegen, welche Zeitabweichungen toleriert werden können.