

Proteinen auf der Spur

Native UV Fluoreszenz: ein markierungsfreies Detektionsverfahren für die höchstempfindliche Analytik von Proteinen in Acrylamidgelen

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) wurde durch Klose und O'Farrell als bioanalytisches Trennverfahren eingeführt [1, 2]. Zusammen mit der Massenspektrometrie von biologischen Makromolekülen steht diese Trennmethode in der Proteomik hinter der Analyse ganzer Proteome. Proteine werden in einer Richtung nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension nach ihrer Masse getrennt. Danach werden sie durch unterschiedliche Färbemethoden lokalisiert und nachgewiesen. Durch das hier vorgestellte neue Verfahren, Proteine durch die native Fluoreszenz der aromatischen Seitenketten (Tryptophan, Tyrosin) im ultravioletten Spektralbereich zu detektieren, wird das Anfärben überflüssig, wodurch zeitraubende Zwischenschritte wegfallen, und die Reproduzierbarkeit, Ausbeute und Empfindlichkeit erhöht wird.



Markierungsfreie UV-Detektion von Proteinen

Neben der sehr guten Reproduzierbarkeit und Detektion ist für eine erfolgreiche Proteomanalyse auch deren Quantifizierung wichtig. Unser neues UV-Detektionsverfahren [3] besitzt mit 1 ng die gleiche maximale Empfindlichkeit wie die Silberfärbung und ist somit 10 mal sensitiver als die weitverbreitete Coomassiefärbung. Darüber hinaus zeichnet sich das neue UV-Verfahren durch einen dynamischen

Bereich von mehr als drei Größenordnungen bei einer sehr hohen Reproduzierbarkeit aus.

Besonders im niedermolekularen Bereich, wo durch die zahlreichen Färb- und Waschschritte die Ausbeute in konventionellen Markierungsverfahren oft leidet, kommt die Sensitivität des direkten Proteinnachweises im Gel besonders zum Tragen, was sich auch bei den nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen positiv auswirkt.

Zur Anregung der nativen Fluoreszenz wurden zwei verschiedene UV Laser (frequenzverdreifachter Ti:SA-Laser mit 150 mW Leistung bei 280 nm und frequenzvervierfacher Nd:YAG mit 4 mW bei 266 nm) eingesetzt. Das erzeugte Fluoreszenzlicht wurde mit einer UV-fähigen, empfindlichen BCCD-Kamera aufgenommen. Durch einen Emissionsfilter (300 nm–375 nm) wird das Anregungslicht und das Umgebungslicht unterdrückt (Abb. 1). Momentan wird das Gel in 1 cm²

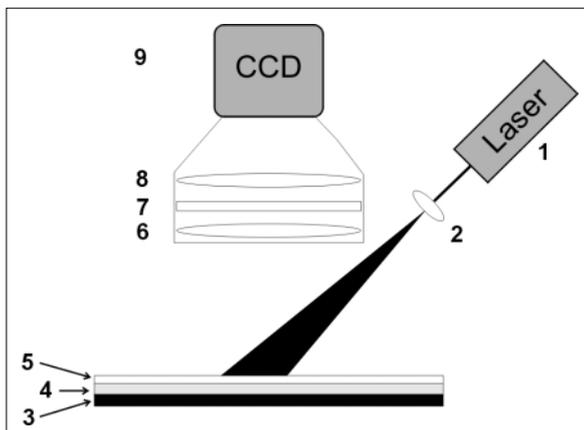


Abb. 1: Experimenteller Aufbau für die UV-Detektion von ungefärbten Proteinen in Acrylamidgelen: (1) UV-Laser, (2) Sphärische Linse ($f=100$ mm), (3) Stahlplatte, (4) Acrylamidgel, (5) Quarzglasplatte, (6) + (8) UV Objektive, (7) Bandpassfilter (300–375 nm), (9) CCD Kamera

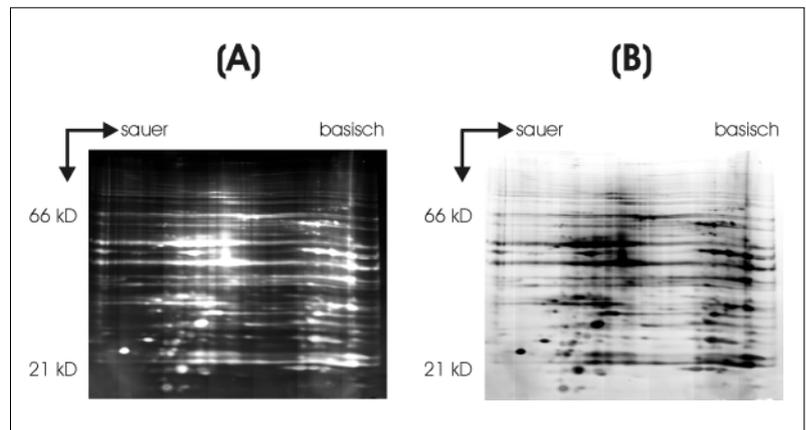


Abb. 2: Zweidimensionale Gelelektrophorese vom cytosolischem Maushirnextrakt (Gesamthirn). 80 μ g Protein wurden in einem 2DE-Gel mit einer Dimension von 6×7 cm² separiert. Die UV-Anregung erfolgte bei 280 nm mit 15 mJ/cm². A) Natives Fluoreszenzsignal der Proteine B) Invertiertes Fluoreszenzbild entspricht der klassischen Darstellung mit dunklen Proteinspots.



Tobias Kahre, Katja Tönsing, Dario Anselmetti, Jan Rögener

großen Abschnitten aufgenommen, die zu einem Gesamtbild mit einer Auflösung bis zu 1.000 dpi zusammengesetzt werden, wobei ein universeller Scanner für Gele von 6 x 8 cm² bis 20 x 30 cm² zur Verfügung steht.

Cytosolisches Maushirnextrakt in 2D-UV-PAGE

Als eine der ersten Anwendungen wurden Gele vom cytosolischen Maushirnextrakt des Gesamthirns in Zusammenarbeit mit Hoffmann-La Roche, Roche Center for Medical Genomics (RCMG), untersucht [4].

Die Proteine fluoreszieren hell in dem UV-transparenten Standard-Acrylamid-

gel (Abb. 2A). Die von der Silberfärbung gewohnte (invertierte) Darstellung ist in Abbildung 2B gezeigt.

Diese ersten Resultate deuten darauf hin, dass im niedermolekularen Bereich unter 50 kDa mehr Proteinspots als durch die Coomassiefärbung nachweisbar sind. So kombiniert die UV Detektion die Vorteile der verschiedenen Färbemethoden. Obwohl die Helligkeit von Tryptophan nur 1 % (Tyrosin 0,1 %) verglichen mit synthetischen Fluoreszenzfarbstoffen [5] beträgt, besitzt sie den Vorteil, dass bei der nativen Fluoreszenz alle Moleküle in einem Spot zum Signal beitragen, also 100 % der Proteine „markiert“ sind. Da viele Proteine sogar mehrere Tryptophane und Tyrosine enthalten erklärt sich auch die hohe Empfindlichkeit des Detektionsverfahrens. 99 % der humanen Proteine > 10 kDa enthalten mindestens eine fluoreszierende Aminosäure und können prinzipiell durch native Fluoreszenz nachgewiesen werden [3]. Ein wichtiger positiver Nebeneffekt ist, dass die Proben, für weitere Analysen (MS) chemisch unverändert zur Verfügung stehen. In der Zukunft ist geplant, den Laser durch eine UV-Lampe zu ersetzen und auf der Basis des eingereichten Patents ein marktfähiges Produkt zu entwickeln.

Referenzen

- [1] Klose J.: *Humangenetik* 26(3), 231–243 (1975)
- [2] O'Farrell P.H.: *J. Biol. Chem.* 250(10), 4007–4021 (1975)
- [3] Roegerer J. *et al.*: *Anal. Chem.* 75(1), 157–159 (2003)
- [4] Die Gele wurden dankenswerter Weise von Dr. P. Berndt, Hoffmann-La Roche, Roche Center for Medical Genomics RCMG, Basel, zur Verfügung gestellt.
- [5] Greulich K.O. in: *Lab Manual: RNP Particles, splicing and autoimmune diseases*, J. Schenkel (Editor) 1998, Springer, 48–71. ISBN: 3-540-62448-1

Dr. Jan Roegerer
Cand. Phys. Tobias Kahre
Dr. Katja Tönsing
Prof. Dr. Dario Anselmetti

Universität Bielefeld
Experimentelle Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften
Universitätsstrasse 25
33615 Bielefeld
dario.anselmetti@physik.uni-bielefeld.de
www.physik.uni-bielefeld.de/biophysik