

# Quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

## KURZBESCHREIBUNG:

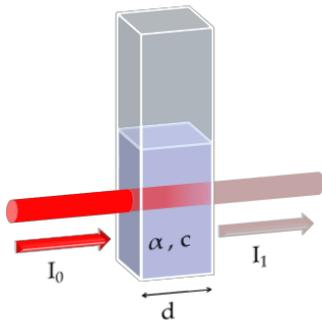
Ziel der Übung ist die Quantifizierung von Proteinen mittels photometrischer Bestimmungsmethoden, wobei die verwendeten Methoden bezüglich Empfindlichkeit, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze verglichen werden sollen. Für eine ausgegebene Proteinlösung unbekannter Konzentration soll die geeignete Kalibrierfunktion für die Berechnung des Proteingehaltes gewählt werden. (Prüfung: Aufbau eines Proteins!)

**SPEKTROSKOPISCHE GRUNDLAGE:** (Analytische Chemie/Latscha oder TeachMe – Instrumentelle Analytik/Lohninger, Fröhlich, Mizaikoff, Rosenberg; alles über Epina Bookshelf zugänglich)

Spektrometrische Verfahren beruhen darauf, dass Lichtquanten bestimmter Energie stoffspezifisch absorbiert werden. Allgemein gilt, dass elektromagnetische Strahlung von Molekülen absorbiert wird. Die Gesetzmässigkeit der Absorption ist durch das **Lambert-Beersche Gesetz** beschrieben:

$$I_1 = I_0 - I_{\text{abs}} \quad \text{bzw.} \quad T (\%) = I / I_0 \quad \text{bzw.} \quad O.D. = I_0 / I$$

$$dI = -\alpha I dx$$



$$\frac{dI}{I} = -\alpha dx$$

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\alpha \int_0^d dx$$

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\alpha d$$

$$I = I_0 e^{-\alpha d}$$

Bezieht man sich auf verdünnte Lösungen ( $c < 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) bei denen ausschliesslich der gelöste Stoff der Konzentration  $c$  absorbiert, folgt daraus:

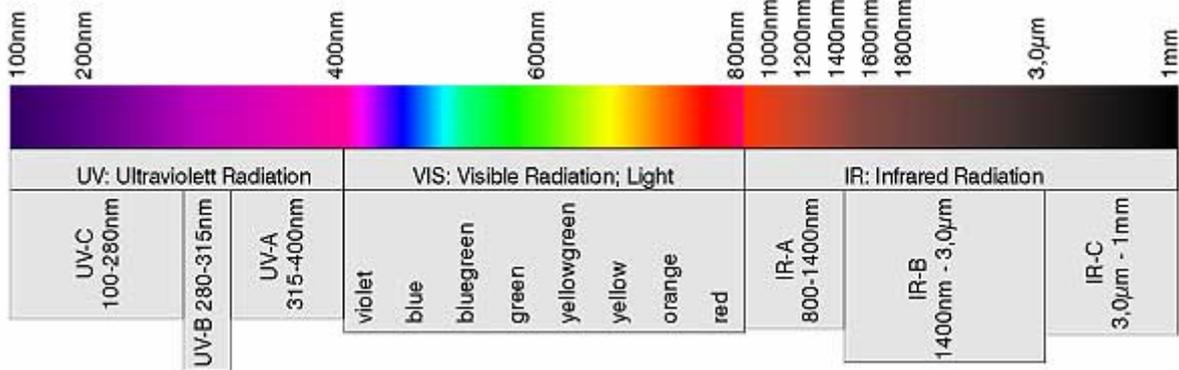
$$E = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon c d \quad \dots \text{ Lambert-Beer'sches Gesetz}$$

**D.h. die Absorption ist direkt proportional (ausgedrückt durch  $\epsilon$ ) zur Wegstrecke  $d$  (cm) in einer Lösung sowie zur Konzentration  $c$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) der Lösung.**

T	...	Transmission (Durchlässigkeit),
O.D.	...	Opazität (optische Dichte = O.D., engl.: Optical density)
E	...	Extinktion
I	...	Intensität eines monochromatischen Lichtstrahls
c	...	Konzentration ( $\text{mol L}^{-1}$ )
d	...	Wegstrecke (cm)
$\alpha$	...	Absorptionskoeffizient
$\epsilon$	...	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient ( $\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ )

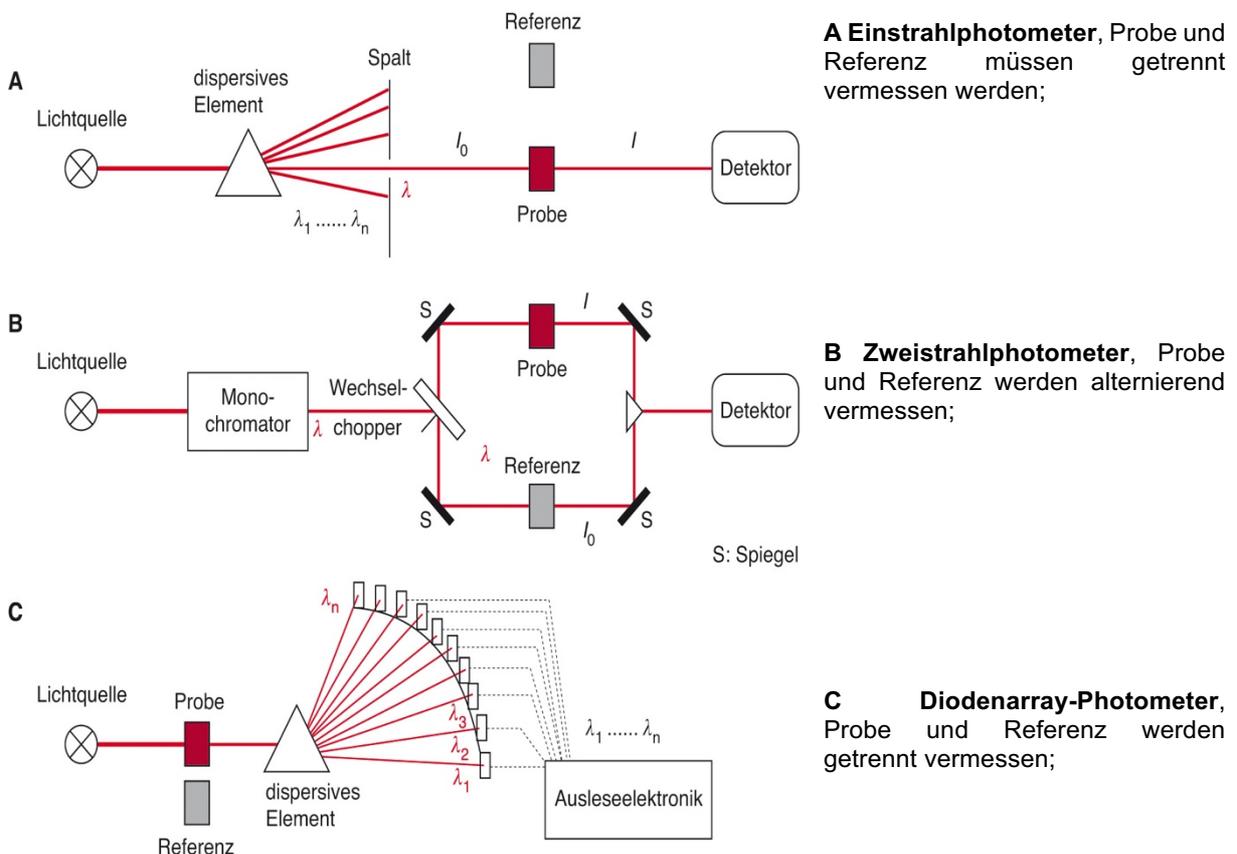
## UV/VIS SPEKTROSKOPIE:

Spektroskopische Messungen können in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen durchgeführt werden, photometrische Messungen meist im UV und VIS Bereich:



Wenn die Eigenabsorption der zu untersuchenden Verbindung nicht ausreicht, um niedrige Konzentrationen verlässlich zu messen, müssen chemische Reaktionen durchgeführt werden. Diese Reaktionen führen zu Verschiebungen der Absorptionsmaxima zu höheren oder tieferen Wellenlängen.

## KLASSISCHE MESSANORDNUNGEN: (Bioanalytik, Lottspeich, Spektrum Verlag)



## UV/VIS BASIERENDE PROTEINBESTIMMUNGSMETHODEN:

### Ohne Verschiebung der Absorptionsmaxima:

Proteine zeigen an der Polypeptidkette und durch ihre prosthetischen Gruppen Absorption. Die Peptidbindung selbst führt zu einem Absorptionsmaximum bei 190 nm. Das zweite Absorptionsmaximum der Peptidbindung, bei ca. 220 nm, ist oftmals durch Absorption der Aminosäureseitenketten überlagert.

Seitenketten der aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin  $\lambda_{\max}$  260 nm, Tyrosin  $\lambda_{\max}$  275 nm, Tryptophan  $\lambda_{\max}$  280 nm) geben eine ausgeprägte Absorption bei 260 – 280 nm. Der Hauptbeitrag stammt von der Aminosäure Tryptophan. Durchschnittliches Vorkommen der wichtigsten UV absorbierenden Aminosäuren in Proteinen: Phenylalanin 3.9 %, Tyrosin 3.2 %, Tryptophan 1.3 %.

Diese Absorption kann zur einfachen, wenn auch nicht sehr genauen, Konzentrationsbestimmung herangezogen werden.

Messung bei 280 nm:

Die photometrische Bestimmung ist durch UV absorbierende Substanzen (Pigmente, phenolische Verbindungen, organische Kofaktoren) beeinträchtigt. So tragen auch Nukleinsäuren zu einer Absorption bei 280 nm bei.

Je nach verwendetem Gerät können Proteinkonzentrationen von 20-3000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  eingesetzt werden.

Messung bei 205 nm:

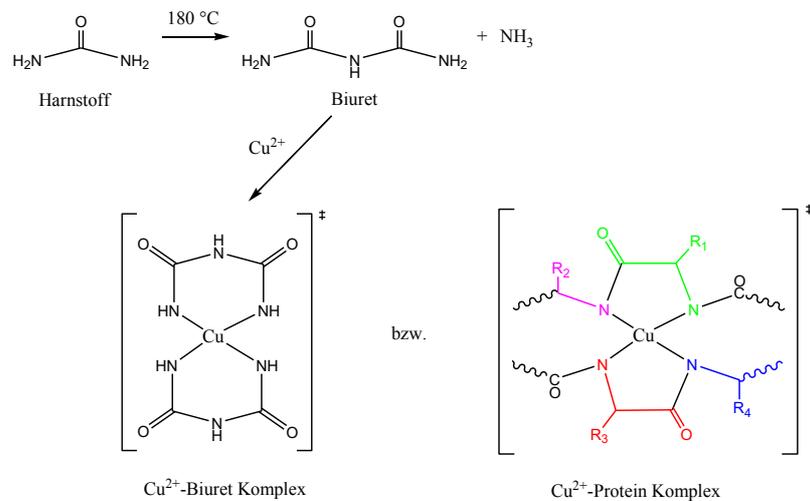
Proteinkonzentrationen von 1-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  können gemessen werden, wobei hier alle Substanzen mit C=C oder C=O Doppelbindungen störend wirken, sowie geringe Verunreinigungen in den verwendeten Pufferkomponenten, die wiederum nicht hoch konzentriert sein dürfen.

### Mit Verschiebung der Absorptionsmaxima:

Methode nach Biuret (Cu basierende Methode):

Der Name dieser Methode beruht auf einer Farbreaktion von gelöstem Biuret (Carbamoylharnstoff  $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ ) und Kupfersulfat in alkalischem, wässrigem Milieu (Biuret – Reaktion). Es entsteht ein rotvioletter Farbkomplex zwischen den  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen und je 2 Biuretmolekülen. Diese Farbreaktion ist typisch für Verbindungen mit mindestens 2 CO-NH-Gruppen (Peptidbindungen) und kann daher auch für den kolorimetrischen Nachweis von Peptiden und Proteinen verwendet werden.

Der farbige Protein-Cu<sup>2+</sup>-Komplex, der bei der Biuret-Reaktion entsteht:



Sind Tyrosinreste vorhanden, tragen diese ebenfalls merklich - durch die Komplexierung von Kupferionen - zur Farbstoffbildung bei. Die Messung des Farbkomplexes kann bei ca. 550 nm erfolgen.

Störend wirken vor allem Ammonium, schwach reduzierende und stark oxidierende Substanzen (Sulfhydrylverbindungen, Natriumphosphat, Glucose, Ammoniumsulfat). Schwache Konzentrationen an Natriumdodecylsulfat (SDS) oder anderen Detergentien sind hingegen tolerabel.

Der Biuret-Assay ist im Vergleich zu anderen Assays der unempfindlichste. Nachweisgrenzen (geräteabhängig): ca 1-10 µg mL<sup>-1</sup>.

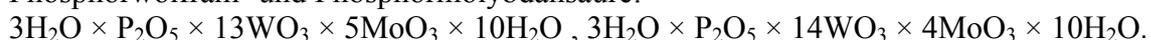
#### Methode nach Lowry:

Unter alkalischen Bedingungen bindet Cu<sup>2+</sup> an den Stickstoff der Amidbindungen der Proteine (Biuret-Reaktion). Dieser Komplex wird im Lowry-Assay, einer Weiterentwicklung des Biuret-Assays, durch Na-K-Tartrat stabilisiert.

Dieser Komplexreaktion folgt eine Reduktion des verwendeten *Folin-Ciocalteau-Phenol* Reagenzes im alkalischen Milieu. Kupfer unterstützt hier den effektiven Elektronentransfer auf die Chromophore dadurch, dass es das Peptidgerüst stabilisiert.

#### *Folin-Ciocalteau-Phenol* Reagens:

Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> Natriumwolframat, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> Natriummolybdat, 85% Phosphorsäure, conc. HCl, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lithiumsulfat und "einige Tropfen" Br<sub>2</sub> (verköcht) reagieren zu hexavalenter Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure:



Das Reagenz enthält somit 6-wertiges Wolfram und Molybdän welche durch polare Aminosäuren, Cystein, Histidin, Tyrosin oder Tryptophan soweit reduziert werden, dass farbige Mischoxide von 4- bis 6-wertigen Metallen entstehen.



Diese Methode ist um den Faktor 2-5 sensitiver als die Lowry-Methode, die Nachweisgrenze liegt zwischen  $0.05\text{-}0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (geräteabhängig). Großer Vorteil: nur wenige Substanzen stören die Komplexbindung.

z.B. Natriumdesoxycholat, hohe Konzentrationen an Triton X-100 ( $> 0,5 \%$ ) und größere SDS Konzentrationen ( $> 0,1 \%$ ). Vor Allem aber ist die Methode tolerant gegenüber Reduktionsmitteln.

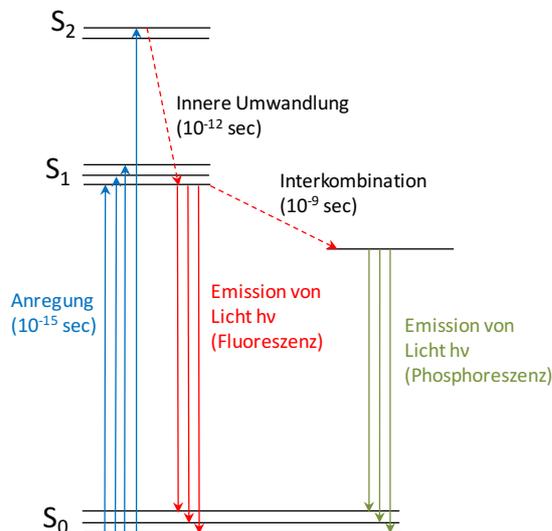
Ein Nachteil der Proteinbestimmung nach Bradford ist, dass die Stabilisierung der Sulfonatform von Coomassie Brilliantblue G-250 vor allem durch oben erwähnte Aminosäuren bewirkt wird und die Empfindlichkeit sich somit von Protein zu Protein stark ändern kann (abhängig von der Primärstruktur des Proteins).

### FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE:

Bei einer großen Zahl organischer Verbindungen kann man nach Einstrahlung in deren Absorptionsbande spontane Emission von Licht beobachten.

Fluoreszenz: (stark vereinfachte Darstellung, ausführlicher siehe Analytische Chemie III)

Absorption von Energie ist für die Anregung von Elektronen aus deren Grundzustand ( $S_0$ ) in einen angeregten Zustand ( $>S_0$ ) verantwortlich. Nach erfolgter Anregung fallen die Elektronen umgehend (innerhalb von Picosekunden) in den für sie energetisch günstigeren Anregungszustand ( $S_1$ ), aus dem sie anschliessend über unterschiedliche Mechanismen weiter Energie abgeben, um wieder den Grundzustand zu erreichen (Jablonski Diagramm):

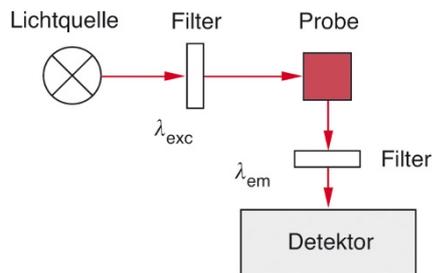


Mögliche Mechanismen der Energiekonversion:

- interne Konversion – Hitze
- externe Konversion – Quenching
- Photonenemission – z.B. Fluoreszenz (spontane Emission kurzer Lebensdauer) bzw. Phosphoreszenz (evtl. verzögerte, aber sicher länger anhaltende Emission)

Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren sind in der Regel verschoben, da der Energieverlust nach dem Anregungsprozess zu einer Verschiebung der Emissionsstrahlung zu größeren Wellenlängen führt.

### KLASSISCHE MESSANORDNUNGEN:



Im einfachsten Fall wird die Probe bei einer festen Wellenlänge ( $\lambda_{exc}$ ) angeregt und die Intensität der Fluoreszenz bei fester Wellenlänge ( $\lambda_{em}$ ) gemessen.

Die beiden Wellenlängen werden durch Filter gewählt, die komplementär sein müssen.

Werden sie durch durchstimmbare Filter (Monochromatoren) ersetzt, so können

**Emissionsspektren** ( $\lambda_{exc}$  fest, Aufzeichnen der Fluoreszenzintensität als Funktion der Emissionswellenlänge  $\lambda_{em}$ ) oder **Aktionsspektren** ( $\lambda_{em}$  fest, Aufzeichnen der Fluoreszenzintensität als Funktion der Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$ ) aufgenommen werden.

### FLUORESZENZBASIERENDE PROTEINBESTIMMUNGSMETHODEN:

Fluoreszenzspektroskopie ist eine der weitverbreitetsten spektroskopischen Methoden im bioanalytischen Bereich. Ohne Farbstoffzugabe kann nur die Fluoreszenz aromatischer Aminosäuren bei etwa  $\lambda_{exc}$  280 nm angeregt und die Emission bei etwa  $\lambda_{em}$  320-350 nm, je nach Protein, gemessen werden.

Tryptophan ( $\lambda_{exc}$  285 nm,  $\lambda_{em}$  360 nm)

Tyrosin ( $\lambda_{exc}$  275 nm,  $\lambda_{em}$  310 nm)

Phenylalanin ( $\lambda_{exc}$  260 nm,  $\lambda_{em}$  283 nm)

Man spricht in diesem Fall von **intrinsischer Fluoreszenz**. Diese Methode ist für Proteinkonzentrationen von 5-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  einsetzbar, aber in einem kleineren Konzentrationsbereich linear und stark abhängig von der Polarität des Lösungsmittels bzw. dessen pH Wert.

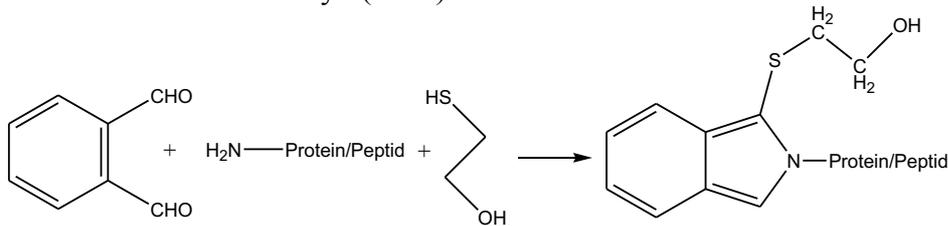
Der Beitrag von Phenylalanin zur Fluoreszenz ist nicht merklich, die Fluoreszenz von Tyrosin ist leicht auszulöschen (quenching), d.h. der Hauptbeitrag für diese Art der Fluoreszenzmessung erfolgt durch Tryptophan.

Da Tryptophan in polarer Umgebung (Lösungsmittel) rotverschobene Fluoreszenz aufweist, kann über die Messung des Emissionsspektrums auf die molekulare Umgebung geschlossen werden.



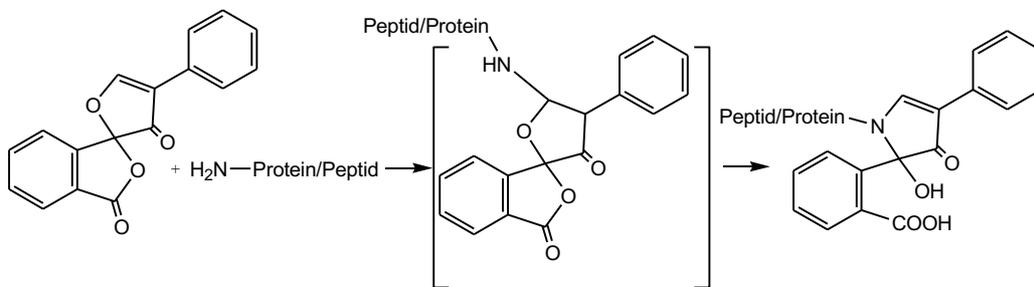
## Typische Fluoreszenzsonden:

Reaktion mit Fluoraldehyd (OPA):



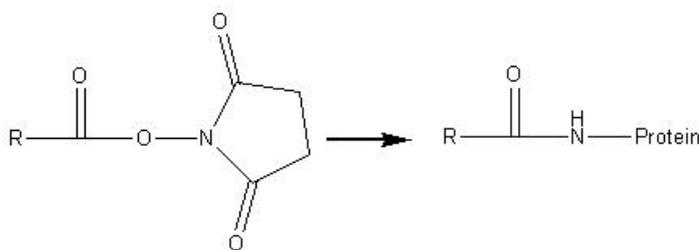
In der Gegenwart von Mercaptoethanol reagiert o-Phthalaldehyd (OPA) mit einem primären Amin (am Peptid/Protein) zu einem fluoreszenzgelabelten Analyten.

Reaktion mit Fluorescamin:



Fluorescamin reagiert mit primären Aminen und der Lysinseitenkette nahezu sofort bei Raumtemperatur und ermöglicht den Nachweis von Proteinkonzentrationen im Picomolbereich.

Reaktion mit NHS (N-Hydroxysuccinimid) – Ester Fluoreszierender Komponenten (Cy3, Cy5, o.ä.):



R = Rest, der „designed“ werden kann: Modulation der Anregungs- und Emissionswellenlängen je nach Anwendungsbereich (z.B. Laserinduzierte Fluoreszenz - LIF) durch den Einsatz unterschiedlich anregbarer Reste

### KALIBRIERFUNKTION:

(LITERATUR: FUNK, DAMMANN, DONNEVERT – QUALITÄTSSICHERUNG IN DER ANALYTISCHEN CHEMIE; WILEY-VCH)

#### Die Kalibrierfunktion:

Ein Analysenergebnis ist immer die Funktion eines Messwertes

$$x' = f(y')$$

und basiert auf der Anwendung der in einem Kalibrierexperiment gewonnenen Kalibrierfunktion:

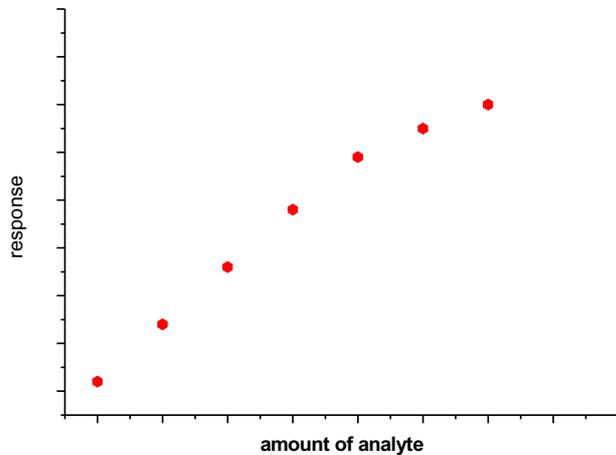
$$\begin{array}{lcl} \text{Messwert} & = & \text{Funktion des Substanzgehaltes} \\ y & = & f(x) \end{array}$$

Löst man diese Gleichung nach  $x$  auf, wird die Kalibrierfunktion zur Erstellung der Analysenfunktion genutzt, die nach dem Einsetzen des Messwertes der untersuchten Probe das Analysenergebnis liefert.

Wahl des Arbeitsbereiches einer Kalibrierfunktion:

- (a) Praxisbezogener Arbeitsbereich – es soll ein größerer Anwendungsbereich abgedeckt sein. Die Arbeitsbereichmitte soll der häufigst zu erwartenden Probenkonzentration entsprechen.
- (b) Technisch realisierbare Gegebenheiten
  - Messwert an der unteren Arbeitsbereichsgrenze muss sich von den Messwerten des Verfahrensblindwertes signifikant unterscheiden.
    - i. Verfahrensblindwert: Messsignal, das erhalten wird wenn die Probe keinen Analyten enthält (Reagentien, Lösungsmittel, ....).
    - ii. Grenze für den unteren Arbeitsbereich: ist nur dann sinnvoll, wenn diese mindestens gleich oder größer der Erfassungsgrenze (s.u.) des Verfahrens ist.
    - iii. Die Verdünnungs- und Konzentrierungsschritte sollen bequem und fehlerfrei realisierbar sein.
  - Geforderte Analysenpräzision muss im gesamten Arbeitsbereich erreichbar sein. Mit zunehmendem Stoffmengengehalt nimmt die Analysenpräzision (absolut) zu.
- (c) Speziell für lineare Regressionsrechnungen:
  - Geforderte Analysenpräzision muss im gesamten Arbeitsbereich konstant sein – andernfalls: starke Erhöhung der Messunsicherheit.
  - Zwischen Substanzgehalt und Messwert muss ein linearer Zusammenhang vorliegen:

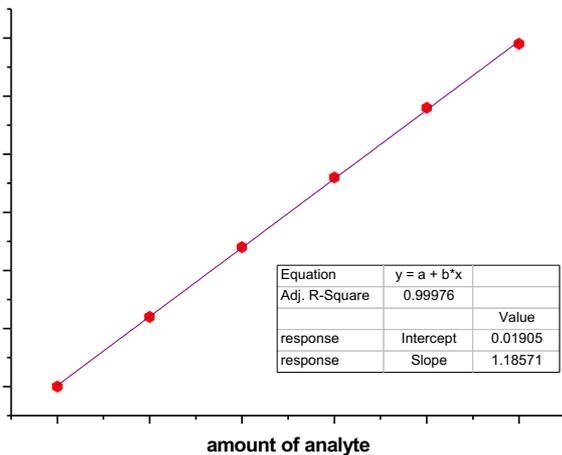
Die Ermittlung des Kalibrierfunktionstyps erfolgt im einfachsten Fall durch graphische Darstellung der Kalibrierdaten indem das Messsignal gegen die Analytkonzentration aufgetragen wird.



Hier liegt der Fall einer linearen Regression vor:  
 $y = a + bx; R^2$

Response = Anstieg  $\times$   
 Konzentration + Achsenabschnitt

*aber:* letzten 2 Messsignale liegen ausserhalb des linearen Bereichs



Die Linearität ( $y = a + bx$ ) ist rechnerisch zu überprüfen und spiegelt sich in  $R^2$  (Korrelation) wieder.

Nachweisgrenze ( $x_N$ ):

Die Nachweisgrenze ist eine Entscheidungsgrenze für den qualitativen Nachweis des Analyten. Sie stellt den kleinsten Messwert dar, der mit einer vorgegebenen Sicherheit vom Blindwert zu unterscheiden ist.

Zur praktischen Ermittlung wird meist die Standardabweichung des Blindwertes (mindestens 6 Blindwerte) herangezogen:

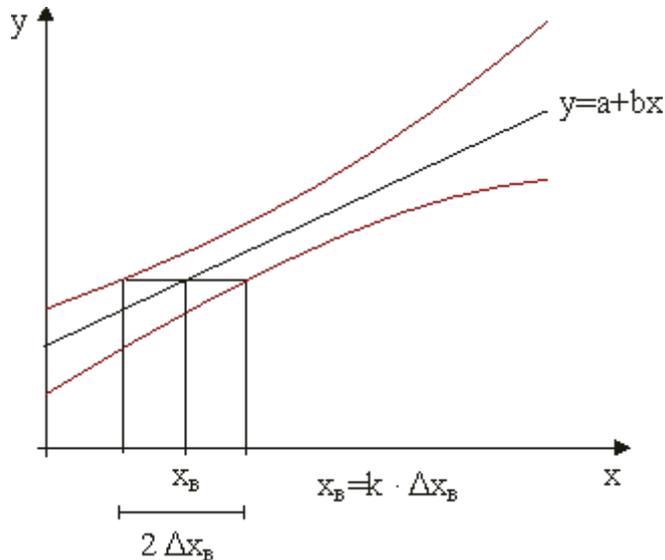
$$x_N = \text{Blindwert} + \text{Prognoseintervall für zukünftige Blindwerte}$$

Erfassungsgrenze ( $x_E$ ):

Die Erfassungsgrenze gibt den Mindestgehalt einer entsprechenden Probe an, der mit hinreichender Sicherheit nachgewiesen werden kann. Die Erfassungsgrenze entspricht dem 2-fachen der Nachweisgrenze:  $x_E = 2 * x_N$

Bestimmungsgrenze ( $x_B$ ):

Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste Menge Gehalt einer Probe, die bei vorgegebener statistischer Sicherheit und maximal zugelassener relativer Abweichung (relativer Vertrauensbereich) quantitativ bestimmbar ist. Der Wert der Bestimmungsgrenze ist damit abhängig vom größten zufälligen Fehler.



$$x_B = 3 * x_N \text{ (als Näherungswert)}$$

t ... Student Faktor

$s_0$  ... Standardabweichung

$VB_{rel}$  ... relative Vertrauensbereich

Die Angabe der  $x_B$  muss immer im Zusammenhang mit dem  $VB_{rel}$  Wert erfolgen !

Kalibrationsempfindlichkeit a:  $y = ax + b$

Die Kalibrationsempfindlichkeit drückt sich mathematisch in der **Steigung der Kalibrierfunktion** aus.

Analytische Empfindlichkeit  $\gamma$ :  $\gamma = a/s_s$

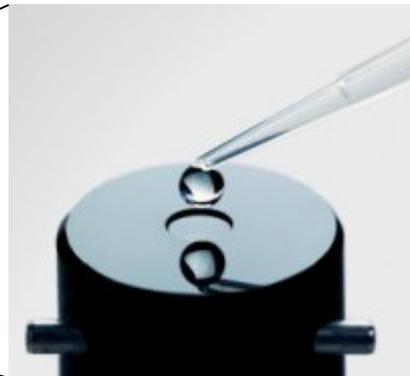
Die analytische Empfindlichkeit drückt sich mathematisch durch den **Quotienten des Anstiegs der Kalibrierfunktion und der Standardabweichung des Messsignals** aus.

**GERÄTE:**

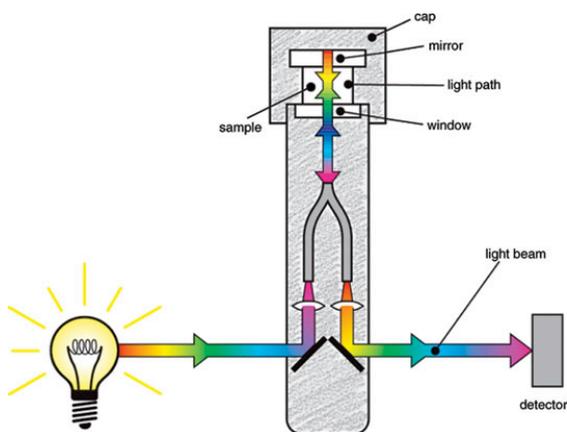
**IMPLEN NANOPHOTOMETER (UV-VIS):**



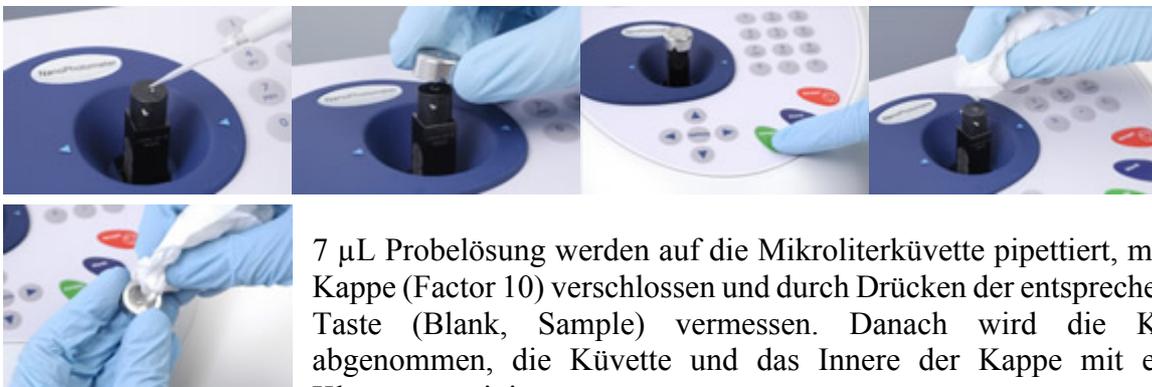
Implen Nanophotometer



LabelGuard Mikroliter-Küvette



Lichtweg in der LabelGuard Mikroliter-Küvette

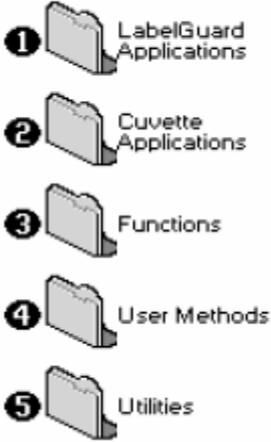
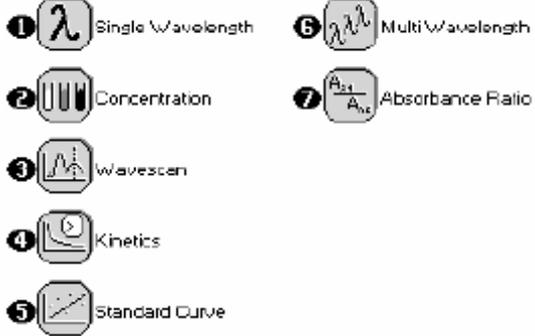
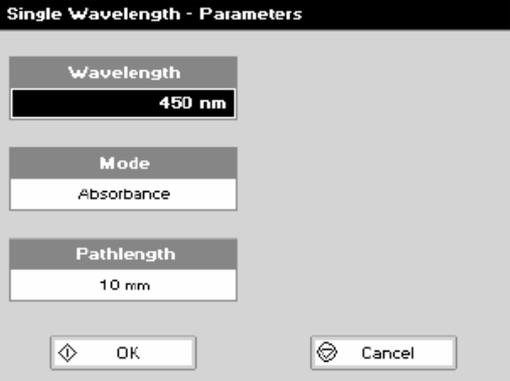
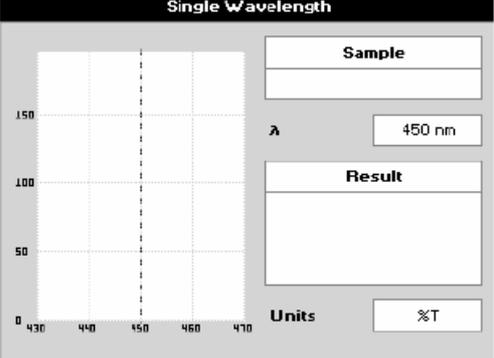
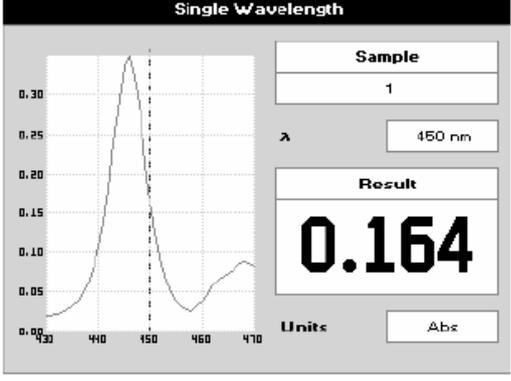


7  $\mu\text{L}$  Probelösung werden auf die Mikroliterküvette pipettiert, mit der Kappe (Factor 10) verschlossen und durch Drücken der entsprechenden Taste (Blank, Sample) vermessen. Danach wird die Kappe abgenommen, die Küvette und das Innere der Kappe mit einem Kleenex gereinigt.

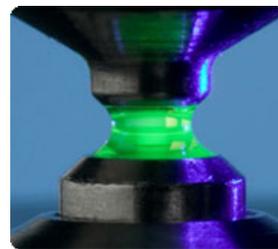
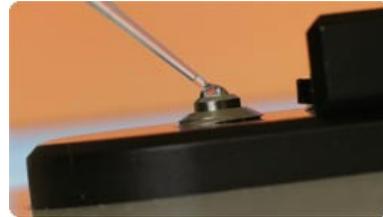
**Method A:** Aufnahme eines Absorptionsspektrums

<p><b>Entrance Screen</b></p> <p>Wählen Sie <i>Functions</i> (3)</p>	<p>Wählen Sie <i>Wavescan</i> (3)</p>																																
<p><b>Wavescan - Parameters</b></p>	<p>wählen Sie folgende Parameter:</p> <p>Start Wavelength: 200 nm          End Wavelength: 800 nm          Mode: Absorbance          Pathlength: 1 mm</p>																																
<p><b>Measurement Screen</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th><math>\lambda</math></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Abs</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Sample <span style="float: right;"><math>\lambda</math> 450nm</span></p> <p>pipettieren Sie 7 <math>\mu</math>L Wasser auf die Probenvorrichtung, schliessen Sie die Kappe und drücken Sie die Blank-Taste (blau).</p>	$\lambda$								Abs								<p><b>Result Screen</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th><math>\lambda</math></th> <th>412</th> <th>446</th> <th>468</th> <th>481</th> <th></th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Abs</td> <td>0.190</td> <td>0.348</td> <td>0.068</td> <td>0.141</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Sample 1 <span style="float: right;"><math>\lambda</math> 450nm Abs 0.164 A</span></p> <p>Nehmen Sie den Deckel ab und entfernen Sie die Flüssigkeit aus dem Deckel und dem Probenfenster.          Nehmen Sie nun 7 <math>\mu</math>L der Probelösung pipettieren diese auf die gesäuberte Vorrichtung und drücken die Sample Taste (rot). Ein Wellenlängenscan wird aufgenommen.</p>	$\lambda$	412	446	468	481				Abs	0.190	0.348	0.068	0.141			
$\lambda$																																	
Abs																																	
$\lambda$	412	446	468	481																													
Abs	0.190	0.348	0.068	0.141																													

**Method B:** Messen der Absorption einer Probe

<p><b>Entrance Screen</b></p>  <p>Wählen Sie <i>Functions</i> (3)</p>	 <p>Wählen Sie <i>Single Wavelength</i> (1)</p>
<p><b>Parameter Screen</b></p> 	<p>wählen Sie folgende Parameter:</p> <p>Wavelength: gewünschte Wellenlänge eingeben          Mode: Absorbance          Pathlength: 1 mm</p>
<p><b>Result Screen</b></p>  <p>pipettieren Sie 7 <math>\mu\text{L}</math> Wasser auf die Probenvorrichtung, schliessen Sie die Kappe und drücken Sie die Blank-Taste (blau). Die Referenz wird gemessen.</p>	 <p>Nehmen Sie nun 7 <math>\mu\text{L}</math> der Probelösung pipettieren diese auf die gesäuberte Vorrichtung und drücken die Sample Taste (rot). Notieren Sie das Ergebnis für Ihre Absorption.</p>

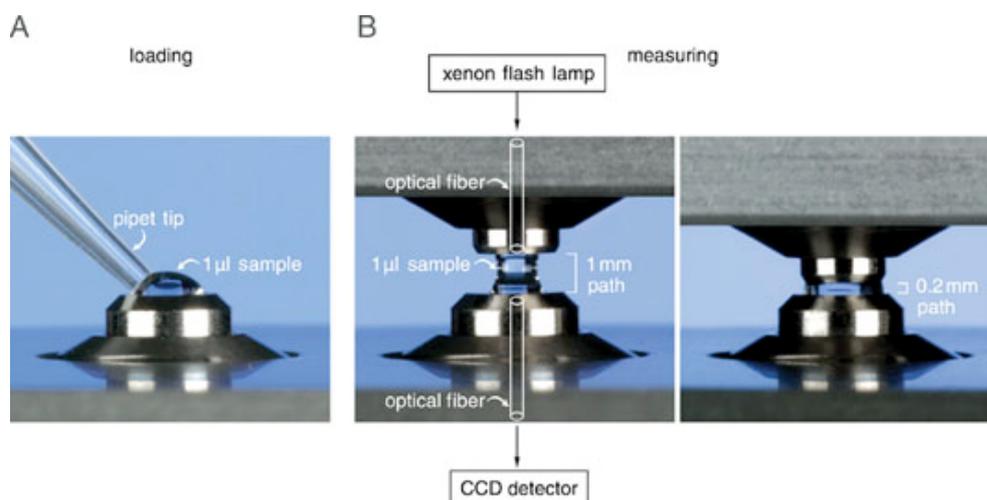
## NANODROP 3300 (FLUORESZENZ):



Ausstattung – 3 LEDs:

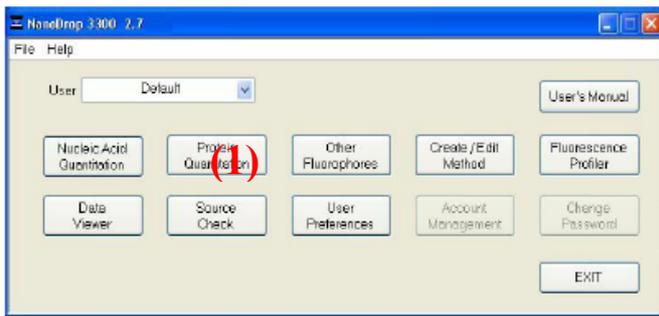
Das Fluoreszenzphotometer ist mit 3 LEDs ausgestattet, die für unterschiedliche Fluoreszenzanwendungen geeignet sind. Für die Vermessung von Fluorescamin gelabelten Proteinen eignet sich das UV LED.

Lichtweg:



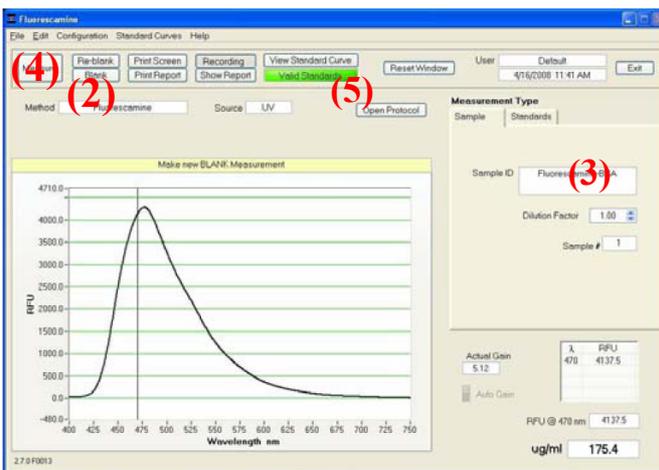
Nachdem man 2 µL Probe auf den unteren Probenteller pipettiert hat, wird der Deckel des Gerätes geschlossen und über die Software die Messung initiiert.

**Method C:** Aufnahme von Fluoreszenzemission (RFU = Relative Fluorescence Unit)



Auf der Bedienungssoftware Nanodrop 3300 wird der Button *Protein Quantitation* (1) ausgewählt und Fluorescamin als Methode gewählt.

Anschließend werden zur Initialisierung des Gerätes 2 µL Wasser auf den Proben-teller pipettiert und der Arm geschlossen.



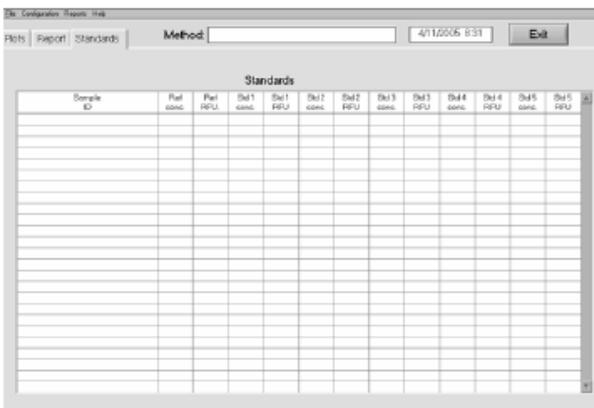
Die Initialisierung erfolgt durch drücken des Button *Blank* (2).

Nach der Initialisierung wird der Wassertropfen vom Proben-teller mit dem dort vorhandenen Kleenex-tuch abgewischt.

Nachdem man 2 µL Probe auf den sauberen Proben-teller pipettiert hat schreibt man die Probenbezeichnung in das Feld *Sample ID* (3) und drückt *Measure* (4).

Danach wischt man die Probe ab, pipettiert die nächste Probe, gibt die Probenbezeichnung an und misst. **Jede einzelne Probe wird 3x gemessen.**

Sobald alle Standards und die Proben gemessen wurden, wählt man *Show Report* (5) und „Save Report as ...“ aus dem Dropdown Menü:



„*Export Report Table Only*“ ermöglicht es, die erhaltene Messwerttabelle als \*.txt abzuspeichern, anschliessend zB in Excel zu importieren und dort eine Kalibrierfunktion zu erstellen.

## ARBEITSANLEITUNG:

ACHTUNG: Alle Glasgefäße vorher gut reinigen, da Sie nicht wissen wie gut Ihr Vorgänger diese gereinigt hat (Proteinspuren).

## Probenvorbereitung:

Für die Probenvorbereitung und die Verdünnungsreihe wird PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline pH 7,4) verwendet (bereitgestellt)

*PBS-Puffer: (Laboranten/Tutoren geben Lösung aus – 20mL je Gruppe)*

*8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0.27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> werden in 800 mL dest. Wasser gelöst, mit NaOH oder HCl der pH auf 7.4 gebracht und anschliessend wird auf 1 L aufgefüllt.*

Die ausgegebene Probe unbekannter Menge wird mit PBS auf 1 mL aufgefüllt und der ausgegebene Standard, gamma Globulin, wird in 1.5 mL PBS gelöst. Damit haben Sie eine 5 mg/mL  $\gamma$ G-Stammlösung hergestellt (**vorsichtig - Probe schäumt; nicht korrekt aufgefüllte Proben (verspritzen) werden NICHT erneut ausgegeben**)

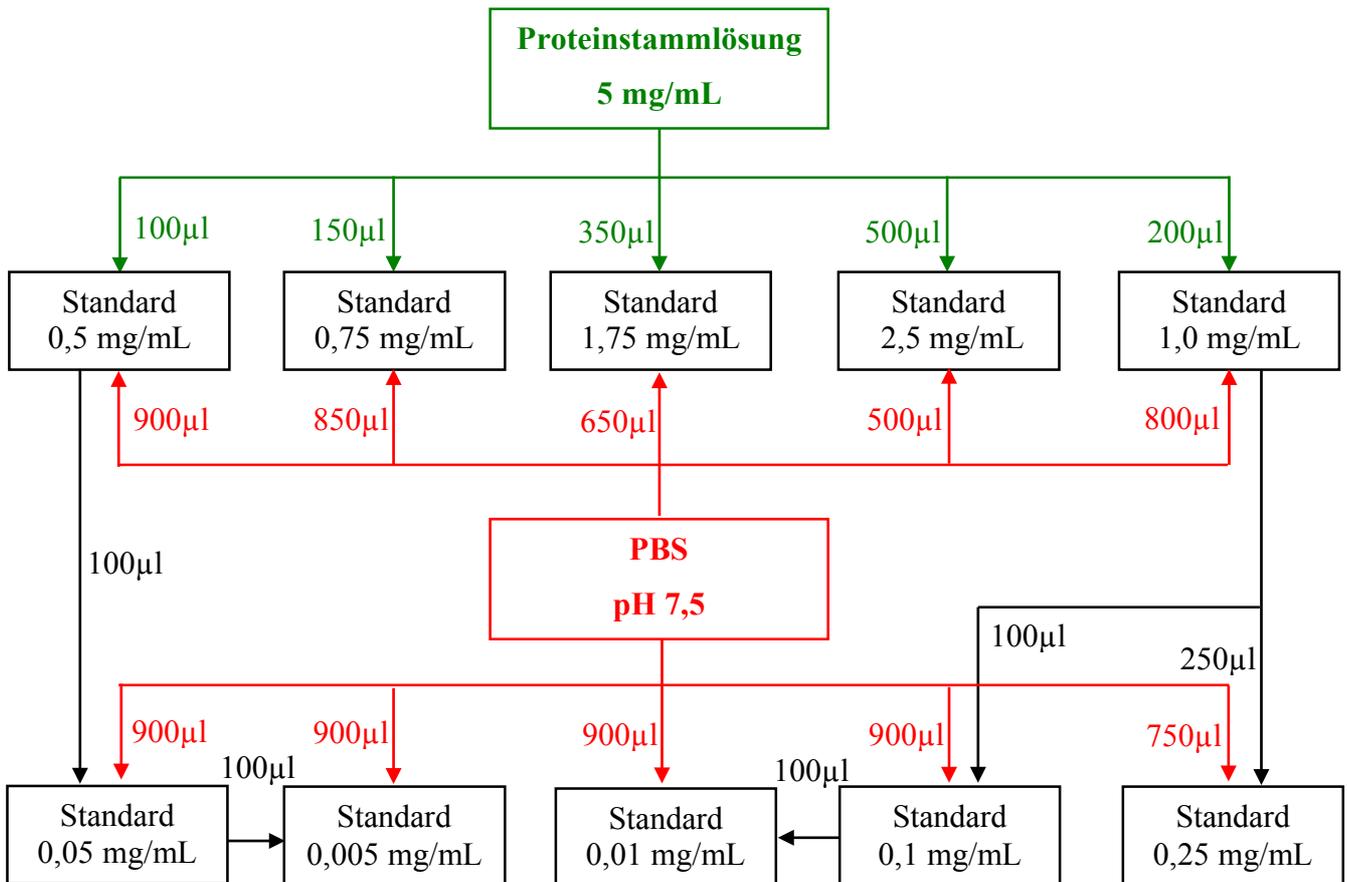
Nach dem Zupipettieren des PBS Puffers das Reaktionsgefäß gut über Kopf schütteln, um sicherzustellen, dass der gesamte Feststoffanteil (auch wenn dieser nicht klar sichtbar ist) im Puffer gelöst ist.

Durch Verdünnen mit PBS werden folgende Proteinkonzentrationen hergestellt:

Erhaltene Lösung [mg/mL]	Proteinlösung		PBS [ $\mu$ L]
	[ $\mu$ L]	[mg/mL]	
2.50	500	5	500
1.75	350	5	650
1.00	200	5	800
0.75	150	5	850
0.50	100	5	900
0.25	250	1	750
0.10	100	1	900
0.05	100	0.5	900
0.01	100	0.1	900
0.005	100	0.05	900

Alle Standards können in entsprechenden Reaktionsgefäßen mit den Volumen 0,5 bzw 1,0 mL hergestellt werden. ACHTUNG: Standard 1,0 mg/mL muss entsprechend portiniert werden.

Pipertierschema:



Jede der Proteinlösungen (insgesamt 13: Proteinstammlösung, 10 Standards, Blindwert, unbekannte Probe) wird nach jeder der genannten photometrischen Methoden bestimmt. Die daraus resultierenden Kalibrierfunktionen werden gezeichnet. Geben Sie bei den Grafiken immer alle Messwerte (entweder einzeln oder als Mittelwert + Standardabweichung) an, auch wenn diese nicht für die Kalibrierfunktion relevant sind. Markieren Sie Werte, die Sie nicht zur Auswertung heranziehen farblich. Fügen Sie die Kalibrierfunktion bei den Werten ein, die Sie zur Erstellung der Geraden herangezogen haben.

Die Konzentration der Probe wird an Hand der am besten geeignet erscheinenden Methode bestimmt.

Ebenso soll der molare Extinktionskoeffizient jeder Bestimmungsmethode bei einer Konzentration von 1 und 0.1 mg mL<sup>-1</sup> berechnet werden und die Kenngrößen der Kalibrierfunktion ermittelt werden ( $x_N$ ,  $x_E$ ,  $x_B$ , (linearer) dynamischer Bereich).

## **Messungen werden nur bei Anwesenheit eines Tutors oder Assistenten durchgeführt !!**

Um eine ausreichend gute Statistik für  $x_N$  zu bekommen, messen Sie bitte 6 Blindwerte je photometrischem Experiment. Daraus können Sie den Vertrauensbereich errechnen.

Der Blindwert einer Messung ergibt sich aus der PBS-Lösung und den entsprechenden Reagentien.

Das UV/Vis Photometer verlangt nach einer Referenzmessung bevor die Absorption der einzelnen Lösungen gemessen werden können. Diese Referenz ist in allen Fällen destilliertes Wasser. (Gerätedetails und Messdetails siehe Geräte/Implen Nanophotometer).

### **Quantitative Proteinbestimmungen ohne Farbreaktion:**

#### Ermittlung der geeigneten Wellenlänge für die Messung im UV/Vis:

Mit Methode A wird das Absorptionsspektrum der Standardlösung (1 mg/mL) aufgenommen und jenes Absorptionsmaximum bestimmt, welches für die Proteinquantifizierung am geeignetsten erscheint.

#### UV/Vis:

Die Absorption der hergestellten Proteinlösungen werden bei der zuvor bestimmten Wellenlänge am Nanophotometer mit Methode B gemessen. Dazu werden jeweils 7  $\mu\text{L}$  der Blindwerte, der Standardlösungen und der Probelösung auf die LabelGurad Küvette pipettiert.

### **Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry:**

#### Herstellung der Farbreagentien:

Lösung A: 0,1M Natronlauge (NaOH) (bei Laboranten/Tutoren)  
(ca. 3-5 mL in einem 5 mL Becherglas)

Lösung B: 4 % Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ) in Wasser (bei Laboranten/Tutoren)  
(ca. 3-5 mL in einem 5 mL Becherglas)

Lösung C: 1 % Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) in Wasser (bei Laboranten/Tutoren)  
(ca. 1 mL, in einem 5 mL Becherglas)

Lösung D: 2 % Na-K-Tartrat in Wasser (bei Laboranten/Tutoren)  
(ca. 1 mL in einem 5 mL Becherglas)

<i>Lowry Reagens A (frisch zubereiten !!!)</i>	In einem 5 mL Becherglas werden 2.45 mL Lösung A + 2.45 mL Lösung B gemischt, danach 50 $\mu\text{L}$ Lösung C zugeben, danach 100 $\mu\text{L}$ Lösung D zugeben.
<i>Lowry Reagens B Folin Ciocalteu abholen bei Laboranten/Tutoren</i>	In einem weiteren 5 mL Becherglas werden 1 mL Folin-Ciocalteu Phenol Reagenz mit 1 mL dest. Wasser gemischt

#### Durchführung:

50  $\mu\text{L}$  Probe (Protein unbekannter Konzentration, Proteinstandardreihe und auch PBS) werden mit 250  $\mu\text{L}$  Lowry Reagenz A versetzt, gut geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach gibt man rasch 25  $\mu\text{L}$  Lowry Reagenz B zu, schüttelt gut und lässt diese Mischung 30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Die Vermessung erfolgt bei 750 nm mit Methode B.

Bei allen Messungen ist darauf zu achten, dass der Zeitraum zwischen dem Mischen der Proteinlösung und der Vermessung in etwa gleich groß ist.

### **Quantitative Proteinbestimmung nach Fluoreszenzderivatisierung mit Fluorescamine:**

Herstellung der Fluorescamin Lösung:

<i>3 mg/mL Fluorescamine Ausgabe</i>	geben Sie 1 mL Aceton (beim Laboranten/Tutoren) in das Eppendorfgefäß mit dem Feststoff
--	---

Durchführung:

150  $\mu\text{L}$  Probelösung (Protein unbekannter Konzentration, Proteinstandardreihe und auch PBS) werden mit 50  $\mu\text{L}$  Fluorescamine Lösung gut vermischt und nach 5 min die Emission bei 470 nm mit Methode C vermessen.

(Aceton ist leicht flüchtig – halten Sie das Gefäß mit dem Derivatisierungsreagens nicht in der warmen Hand, da sich die Konzentration durch die Verflüchtigung des Lösungsmittels stark ändert)

### **ERMITTLUNG DER KALIBRIERFUNKTIONEN:**

Tragen Sie für jede photometrische Bestimmung die gemessenen Absorptions- bzw. Emissionswerte gegen die hergestellten Proteinkonzentrationen auf. Beurteilen Sie visuell, welcher Bereich der Kalibrierfunktion linear ist. Berechnen Sie anschliessend die Kalibrierfunktion und dessen Korrelation für diesen Bereich.

Aus den gemessenen Blindwerten (6 unabhängige Messwerte) können Sie die Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und Erfassungsgrenzen für jede Proteinbestimmungsmethode ermitteln.

Die molaren Extinktionskoeffizienten ermitteln Sie als Mittelwert aus 3 Einzelmessungen. Dazu ziehen Sie 3 unterschiedliche Konzentrationen aus der Mitte des linearen Kalibrationsbereichs jeder photometrischen Bestimmung heran.

### **BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION DER UNBEKANNTEN PROBE:**

Sie haben Ihre Probe mit allen vorgegebenen Proteinbestimmungsmethoden gemessen. Für die Auswertung (d.h. die Bestimmung des Proteingehalts Ihrer Probe) verwenden Sie nur solche Kalibrierfunktionen, die eine ausreichende Empfindlichkeit und Linearität für Ihre Probe haben.

Vergleichen Sie dazu den Absorptions-/Emissionswert Ihrer Probe mit der Kalibrierfunktion – Wo liegt meine Probe auf der Geraden?

Für den Fall, dass mehr als eine Kalibrierfunktion für die Konzentrationsermittlung geeignet erscheint, vergleichen Sie die Ergebnisse (mg/mL) für Ihre Probe und geben bei guter Übereinstimmung einen Mittelwert (inkl. Vertrauensbereich) ab oder wählen Sie eine Methode, die Ihnen am sinnvollsten erscheint. In letzterem Fall ist unbedingt eine Begründung im Protokoll anzugeben!

Für die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten müssen Sie die Proteinkonzentrationen in der Probelösung berücksichtigen (durch Zusatz der Reagenzien werden die Proteinlösungen teilweise weiter verdünnt und somit ändert sich die Konzentration).

**PROTOKOLLIERUNG:**

- (1) Angabe des Absorptionsmaximums/der Absorptionsmaxima der Proteinlösung und Angabe der Wellenlänge bei der die Quantitative Proteinbestimmung ohne Farbreaktion durchgeführt wurde.
- (2) Dokumentation der Kalibrierfunktionen, umfassend je eine graphische Darstellung mit Kalibrierpunkten, den dazugehörigen Kalibrierfunktionen und Angabe der statistischen Kenndaten der Regressionsgeraden (Geradenfunktion, Korrelation)
- (3) Vergleichende Angabe der folgenden Kenndaten für jede der Bestimmungsmethoden:
  - Nachweisgrenze
  - Empfindlichkeit
  - Bestimmungsgrenze
  - Erfassungsgrenze
  - molare Extinktionskoeffizienten
- (4) Aussage, welche Methode am Empfindlichsten ist und welche Methode, die niedrigste Erfassungs- und Bestimmungsgrenze hat.
- (5) Angabe der Proteinkonzentration in Ihrer Probe