

Fluoreszenzsonden

Ein Chamäleon-Marker zur Anfärbung und quantitativen Bestimmung von Proteinen

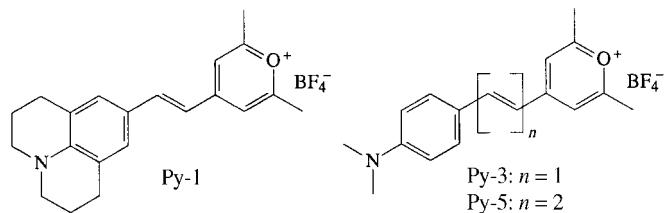
Bianca K. Wetzl, Sergiy M. Yarmoluk, Douglas B. Craig und Otto S. Wolfbeis*

Die Proteomik umfasst die Untersuchung von Proteinen und ihren zeitabhängigen Veränderungen sowie die Interpretation ihrer Funktion.^[1] Proteinproben können durch eine Reihe von Methoden, z.B. durch Gelelektrophorese, Blotting oder mithilfe von Biochips^[2] analysiert werden. Biochips und Protein-Arrays werden vorwiegend für Proteine von bekannter Zusammensetzung verwendet, die Elektrophorese kann dagegen in ein- und zweidimensionaler Form auch für unbekannte Protein-Gemische eingesetzt werden.^[2] Durch die Gelelektrophorese werden die Gemische getrennt, und die Proteine werden mit unterschiedlichen Methoden, z.B. durch Visualisierung, nachgewiesen.^[3] Standardmethoden zur Visualisierung sind die Anfärbung der Protein-Banden mit Silber oder mit Farbstoffen wie Coomassie-Brillantblau (CBB) oder Amidoschwarz B.^[4] Fluoreszenzmethoden zur Anfärbung und Visualisierung von Proteinen sind wegen der hohen Empfindlichkeit von Laser-induzierter Fluoreszenz, die mittlerweile in Lösung die Picomol- (in manchen Fällen sogar die Einzelmolekül-) Ebene erreicht hat, von besonderem Interesse.

Man unterscheidet zwei Klassen von fluoreszierenden Protein-Färbereaganten: Bei der ersten Klasse wird der Marker kovalent an eine funktionelle Gruppe der Proteine (z.B. eine Amino- oder Sulfanyl-Gruppe) gebunden. Die zweite Klasse umfasst Farbstoffe, die eine nichtkovalente Bindung mit dem Protein eingehen. Beide Klassen haben Vor- und Nachteile: Eine kovalente Bindung an ein Protein ist stabil, und der Farbstoff kann nicht ausgewaschen werden. Dagegen ermöglicht eine nichtkovalente Markierung eine massenspektrometrische Analyse der Proteine nach der Gelelektrophorese, da sich die absolute Masse des Proteins durch die Anfärbung nicht ändert.^[5] Typische Färbereaganten, die sich nichtkovalent an Proteine anlagern, sind z.B. die SYPRO-Farbstoffe (organische oder metallorganische fluoreszierende Chromophore), die rotes oder rosafarbene Licht emittieren.^[6] Die Farbstoffe binden mit einer hohen Affinität an Proteine und können anschließend im Gel in Mengen von 2–10 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden. Die kova-

lente Markierung von Proteinen wird dagegen häufig bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) eingesetzt. Die Konjugation kann durch vorheriges Anfärben der Protein-Mischung oder durch Anfärbung nach der Elektrophorese erfolgen. Eine große Zahl an kovalent bindenden Farbstoffen ist bekannt.^[6–8] Diese Farbstoffe haben sehr ähnliche spektrale Eigenschaften in freier wie in Protein-gebundener Form. Deshalb ist es erforderlich, beim Anfärben nach der Elektrophorese den Überschuss an freiem Farbstoff sorgfältig vom Gel oder Blot auszuwaschen, um dadurch die Fluoreszenz des Hintergrunds zu minimieren.

Wir stellen hier eine neue Klasse reaktiver Farbstoffe für die Gelelektrophorese vor, die auch zur quantitativen Protein-Bestimmung genutzt werden kann. Es ist bekannt, dass eine Pyrylium-Einheit mit primären Aminen reagiert und dadurch die entsprechende Pyridinium-Einheit gebildet wird.^[9] Wir haben neue Marker durch Anbringen einer



Pyrylium-Einheit an einer kleinen aromatischen Einheit synthetisiert – dadurch ist einer der kleinsten blauen fluoreszierenden Chromophore entstanden, die wir kennen. Der Marker Py-1 wird in einem einzigen Reaktionsschritt und in guter Ausbeute aus dem entsprechenden Benzaldehyd-Derivat und 1,3,6-Trimethylpyrylium-Tetrafluoroborat synthetisiert. Die spektralen Eigenschaften sind in Abbildung 1 und in Tabelle 1 dargestellt. Py-1 ist blau, fluoresziert nur schwach und reagiert mit primären Amino-Gruppen von Proteinen (aber auch mit Amino-modifizierter DNA und anderen primären Aminen, z.B. Dopamin) in wässriger Lösung bei

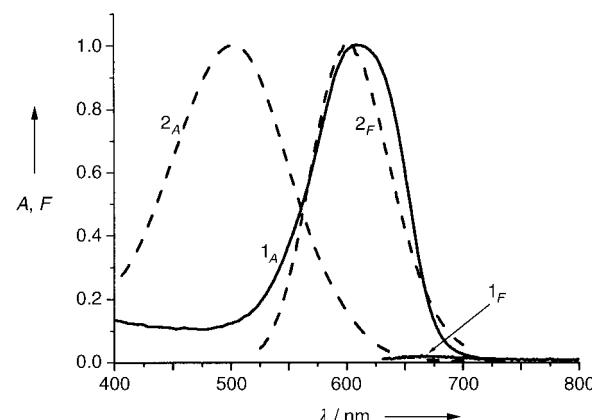


Abbildung 1. Normalisierte Absorptions- und Emissionsspektren des Markers Py-1 (1_A , 1_F) und seines Konjugats mit Human-Serumalbumin (2_A , 2_F) in einem 22 mM Phosphatpuffer bei pH 7.2. Die molaren Extinktionskoeffizienten des Markers und des Farbstoffs im Konjugat betragen 63 000 bzw. 24 000 $\text{L cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$. Das Farbstoff/Protein-Verhältnis in diesem Konjugat beträgt 1.7:1. A = Absorption, F = Fluoreszenz.

[*] Dipl.-Chem. B. K. Wetzl, Prof. Dr. D. B. Craig, [+] Prof. Dr. O. S. Wolfbeis
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
Universität Regensburg, 93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4064
E-mail: otto.wolfbeis@chemie.uni-regensburg.de

Dr. S. M. Yarmoluk
Department of Combinatorial Chemistry
Institute of Molecular Biology and Genetics
Academy of Sciences, UI-03187 Kiew (Ukraine)
[†] Humboldt-Stipendiat (Department of Chemistry, University of Winnipeg, Kanada).

Tabelle 1: Photophysikalische Eigenschaften der Farbstoffe Py-1, Py-3 und Py-5 in Lösung und nach der Konjugation mit Human-Serumalbumin.

Marker	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}/\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ freier Marker [nm]	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}/\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ Konjugat [nm]	$\phi [\%]$ ^[a,b]	$t [\text{ns}]$ ^[c]
Py-1	621/665	503/602	≤ 50	2.8
Py-3	572/641	464/582	≤ 10	2.3
Py-5	644/732	465/629	≤ 15	2.3

[a] ϕ : Quantenausbeute des Konjugats; die Quantenausbeuten der freien Marker sind $< 1\%$. [b] Ebenfalls abhängig vom Farbstoff/Protein-Verhältnis (üblicherweise am besten zwischen 0.5 und 1.0). [c] t : Abklingzeit des Konjugats; die Abklingzeiten der Marker Py-1, Py-3, Py-5 betragen weniger als 0.5 ns.

pH 8–9 und Raumtemperatur unter Bildung einer kovalenten Bindung zu rot gefärbten Konjugaten. Gleichzeitig steigt die Fluoreszenzquantenausbeute je nach Protein und abhängig vom Farbstoff/Protein-Verhältnis (DPR) bis auf 50%. Wegen dieser sehr deutlichen und auch visuell erkennbaren Veränderung von Farbe und Fluoreszenz nennen wir diese Farbstoffe Chamäleon-Marker. Ihre spektralen Eigenschaften können durch die Variation der Endgruppen und der Kettenlänge modifiziert werden. Dies wird durch die Synthese der Farbstoffe Py-3 und Py-5, die ebenfalls mit Proteinen reagieren, demonstriert.

Die Fluoreszenz des roten Konjugats aus Py-1 und einem Protein wird im Bereich von 470 bis 530 nm angeregt; es eignen sich also mehrere Standardlaser als Anregungsquellen. Der freie, blaue Farbstoff wird bei diesen Wellenlängen nicht angeregt. Deshalb wird die Fluoreszenz des gefärbten Proteins gegen eine sehr schwache Hintergrundstrahlung gemessen, auch wenn noch Reste an freiem Farbstoff vorliegen.

Zusätzlich haben die Chamäleon-Farbstoffe noch zwei weitere interessante Eigenschaften: Zum einen wächst die Proteinmasse durch die Anfärbung nur sehr wenig ($\Delta m = 288 \text{ g mol}^{-1}$, wenn jedes Protein mit einem Py-1-Molekül markiert wird); zum anderen wird die Ladung des Proteins durch die Konjugation mit dem Farbstoff nicht verändert, da eine positiv geladene Amino-Gruppe durch eine positiv geladene Pyridinium-Einheit ersetzt wird. Diese zweite Eigenschaft ist besonders bedeutsam, da ein mehrfaches Anbringen eines ungeladenen oder negativ geladenen Farbstoffs an ein Protein die Bildung unterschiedlich geladener markierter Protein-Typen hervorruft. Durch diesen Effekt kann dasselbe Protein mehrere Migrationsgeschwindigkeiten bei der (Kapillar-)Elektrophorese aufweisen. Dadurch können je nach Detektionsmethode die Proteinbanden verbreitert werden, oder man beobachtet mehr als einen Peak für ein Protein.^[10]

Der Farbstoff Py-1 wurde auf seine Anwendbarkeit bei der Elektrophorese auf SDS-PAGE-Gelen (SDS = Natriumdodecylsulfat) getestet. Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse einer Auftrennung von zehn Proteinen durch Elektrophorese.^[11] Das Gel wurde mit einem Standardlaserscanner^[12] analysiert. Die Ergebnisse (siehe Tabelle 2) belegen, dass sogar bei diesem ersten und noch nicht optimierten Experiment die Nachweisgrenzen der meisten Proteine vergleichbar mit dem hochempfindlichen, aber mühsamen Silber-Färbe-

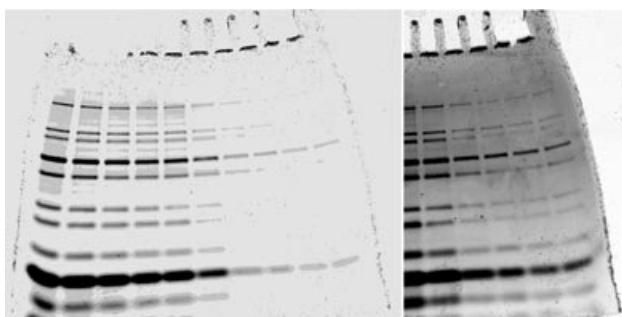


Abbildung 2. Links: Standard-SDS-Polyacrylamid-Gel mit zehn Linien einer Verdünnungsreihe des Massenstandards.^[11] Rechts: Rechte Seite des Gels (Linien 5–10). Die Intensitäten beider Gele sind invertiert abgebildet.

Tabelle 2: Nachweisgrenzen der Proteine (ng/Bande) in SDS-PAGE, erhalten durch Anfärben mit Silber, CBB oder Py-1.

Protein	Silber ^[a]	CBB ^[a]	Py-1
Myosin	1	8–16	1
β -Galactosidase	3	8–16	0.8
Glycogen-Phosphorylase	1	16–30	3
Rinderserum-Albumin	3	16–30	< 2.5
Glutamat-Dehydrogenase	3	16	< 0.8
Lactat-Dehydrogenase	n. b.	n. b.	4
Kohlensäure-Anhydrase	6	16–30	4
Trypsin-Inhibitor	3	16–30	12
Lysozym	4	16–30	14
Aprotinin	6	16–30	4

[a] Daten aus Lit. [6a].

reagens sind. Die Nachweisgrenze liegt für viele Proteine sogar niedriger als bei Verwendung des traditionellen Coomassie-Brillantblau (CBB) und der SYPRO-Farbstoffe.^[6] Es ist allerdings zu beachten, dass die meisten kovalent bindenden Farbstoffe mit der als Analysemethode eingesetzten Massenspektrometrie nach der Gelelektrophorese nicht gut verträglich sind. Obwohl Py-1 sehr klein ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Marker (besonders bei mehreren Farbstoffmolekülen pro Protein) die MS-Analyse erschwert.

Py-1 kann auch zum quantitativen Nachweis von Proteinen in Lösung verwendet werden. Um dies zu demonstrieren, wurden zahlreiche Proteine in Natriumcarbonatpuffer gelöst und mit einer Lösung von Py-1 in wässrigem Dimethylformamid oder wässrigem Methanol versetzt.^[13] Hierbei konnte ein Farbumschlag von Blau nach Rot beobachtet werden. Man kann sowohl die Absorptions- als auch die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Protein-Konzentration bestimmen. Ein quantitativer Fluoreszenznachweis von Rinderserum-Albumin (BSA) ist in Abbildung 3 gezeigt. Wegen der starken Fluoreszenz und der Helligkeit des Protein-Farbstoff-Konjugats konnte in diesem Versuch eine Protein-Konzentration von weniger als 60 ng mL^{-1} nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze bei diesem Experiment liegt damit vergleichbar hoch, oft sogar niedriger als bei der Verwendung der empfindlichsten uns bekannten Assay-Sys-

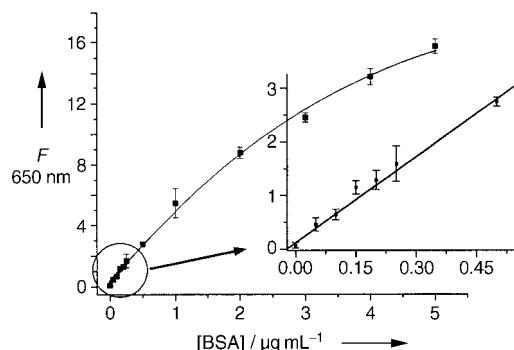


Abbildung 3. Eichkurve zur Konzentrationsbestimmung von Rinderseum-Albumin (BSA) mit dem Marker Py-1. Der Einschub zeigt die außergewöhnliche Empfindlichkeit (die Nachweisgrenze für BSA liegt bei ca. 60 ng mL^{-1}) und die gute Reproduzierbarkeit (kleine Standardabweichungen) der Methode.

teme, z.B. der häufig genutzten Lowry-, Biuret-[14] oder ATTO-TAG-[15]-Assays. Darüber hinaus wird bei diesem neuen Assay-Typ das Protein nicht durch schlecht nachvollziehbare Redoxreaktionen (wie beim Lowry- und Biuret-Assay) verändert und kein hochgiftiges Cyanid benötigt (wie beim ATTO-TAG-Assay).

Wir haben mit Py-1 und den davon abgeleiteten Farbstoffen Py-3 und Py-5 eine neue Klasse von Protein-Färbe-reagentien synthetisiert, die in der Protein-Forschung, z.B. für SDS-PAGE-Experimente, und auch zur allgemeinen quantitativen Protein-Bestimmung in Protein-Assays eingesetzt werden kann. Die Vorteile dieser Farbstoffe liegen a) in ihrer einfachen Synthese, b) im deutlichen Farbumschlag beim Markieren der Biomoleküle, c) im Übergang von einem nicht fluoreszierenden Farbstoff zu einem stark fluoreszierenden Konjugat, d) in der Verlängerung der Abklingzeit auf $>2 \text{ ns}$, e) in der sehr niedrigen Nachweisgrenze bei der Protein-Bestimmung und f) in der gleich bleibenden Proteinladung bei der Reaktion mit dem Farbstoff.

Eingegangen am 29. April 2004

Stichwörter: Elektrophorese · Fluoreszenzsonden · Proteine · Proteomik

- [1] a) M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *19*, 242–247; b) J. Reidl, J. Hacker, *Mol. Infect. Biol.* **2002**, *187*–193.
- [2] a) C. D. O'Connor, K. Rickard, *Microarrays Microplates* **2003**, 61–68; b) P. Cutler, *Proteomics* **2003**, *3*, 3–18.
- [3] a) J. H. Issaq, *Adv. Protein Chem.* **2003**, *65*, 249–269; b) M. Zhou, L. Yu, *Adv. Protein Chem.* **2003**, *65*, 57–84.
- [4] a) P. J. Wirth, A. Romano, *J. Chromatogr. A* **1995**, *698*, 123–143; b) J. P. Goldring, L. Ravaioli, *Anal. Biochem.* **1996**, *242*, 197–201; c) W. F. Patton, *J. Chromatogr. B* **2002**, *77*, 3–31;
- [5] J. C. Nishihara, K. M. Champion, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2203–2215.
- [6] a) T. H. Steinberg, L. J. Jones, R. P. Haugland, V. L. Singer, *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 223–237; b) M. F. Lopez, K. Berggren, E. Chernokalskaya, A. Lazarev, M. Robinson, W. F. Patton, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3673–3683; c) W. F. Patton, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1123–1144.

- [7] R. M. Leimgruber, J. P. Malone, M. F. Radabaugh, M. L. LaPorte, B. N. Violand, J. B. Monahan, *Proteomics* **2002**, *2*, 135–144.
- [8] a) J. Bergquist, S. D. Gilman, A. G. Ewig, R. Ekman, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3512–3518; b) K. E. Asermely, C. A. Broomfield, J. Nowakowski, B. C. Courtney, M. Adler, *J. Chromatogr. B* **1997**, *695*, 67–75.
- [9] O. M. Kostenko, S. Y. Dmitrieva, O. I. Tolmachev, S. M. Yarmoluk, *J. Fluoresc.* **2002**, *12*, 173–175.
- [10] D. B. Craig, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2493–2494.
- [11] a) Protein-Mischung: Myosin ($M_r=220000$), 80 ng/Bande; β -Galactosidase ($M_r=116000$), 50 ng/Bande; Glycogen-Phosphorylase ($M_r=97000$), 150 ng/Bande; Albumin ($M_r=66000$), 250 ng/Bande; Glutamat-Dehydrogenase ($M_r=55600$), 80 ng/Bande; Lactat-Dehydrogenase ($M_r=36500$), 80 ng/Bande; Kohlensäure-Anhydrase ($M_r=29000$), 80 ng/Bande; Trypsin-Inhibitor ($M_r=20000$), 250 ng/Bande; Lysozym ($M_r=14000$), 700 ng/Bande; Aprotinin ($M_r=6100$), 180 ng/Bande. Der Verdünnungsfaktor dieser Protein-Mischung beträgt von Linie 1 bis 10 (Abbildung 2) 0.0, 1.3, 1.7, 2.0, 2.5, 5.0, 10.0, 12.5, 16.7, 20.0. b) Reagenzien und Konditionen der Elektrophorese: Tris/HCl (450 mM) als Probenpuffer (Tris = 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol), Glycerin (12%), SDS (4%), Coomassie-Brillantblau G (0.0025% in Wasser), Phenolrot (0.0025%), pH 8.45, Laufpuffer (pH 8.3; enthält Tris/HCl (25 mM), Glycerin (192 mM) und SDS (0.1%)), 125 V, Stromstärke von 80 mA (am Anfang) bis 40 mA (am Ende des Laufes; 90 min), vertikale Zelle. c) Färbung: Nach der Elektrophorese werden die Gele mit einer Lösung aus 50% Methanol, 10% Essigsäure und 40% destilliertem Wasser 3 min inkubiert, in 50-proz. wässrigem Methanol gewaschen und anschließend zweimal mit einem Gemisch aus 50% Triethylammoniumacetat(TEAA)-Puffer (pH 10) und 50% Methanol fixiert. Die Färbung der Gele wird in einer frisch zubereiteten 0.004-proz. Lösung des Farbstoffs Py-1 in einer 1:1-Mischung aus Methanol und TEAA-Puffer durchgeführt (Py-1 muss in wenig DMF vorgelöst werden). Die Färbezeit hängt von der Dicke und dem Prozentanteil des Gels ab. Die Färbung ist keine Endpunktfärbung. Das Gel kann nicht überfärbt werden, d.h., die Färbung kann auch über Nacht durchgeführt werden. Das Gel wird nach dem Färben gewaschen: a) in einer Waschlösung aus 50% Methanol und 50% TEAA-Puffer und b) mehrmals in einer Entfärberlösung aus 5% Methanol, 7% Essigsäureanhydrid und 88% destilliertem Wasser. Anschließend kann das Gel gemessen oder getrocknet werden. Die Farbbanden auf dem Gel sind im nassen Zustand weitere zwei Tage stabil.
- [12] Es wurde ein Fluoreszenzscanner der Firma Tecan FL200 (siehe www.tecan.com) verwendet; Anregung bei 542 nm (Argon-Laser); Emissions-Filter bei 630 nm.
- [13] Eine BSA-Stammlösung ($20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) wurde in Natriumcarbonatpuffer (pH 9) hergestellt und in einer Mikrotiterplatte auf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt. Py-1 wurde aus einer methanolischen Stammlösung ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von $2.5 \text{ } \mu\text{M}$ verdünnt. Der Einschub in Abbildung 3 zeigt die Kurve, die bei sehr kleinen Protein-Konzentrationen erhalten wird. Jeder Datenpunkt wurde aus fünf Einzelmessungen ermittelt. Die Nachweisgrenze für diese Bestimmung liegt bei $0.06 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.
- [14] a) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. L. Randall, *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275; b) K. Wickelman, R. Braun, J. Fitzpatrick, *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 231–237; c) H. Zheng, Y. X. Mao, D. H. Li, C. Q. Zhu, *Anal. Biochem.* **2003**, *318*, 86–90; d) C. V. Sapan, R. L. Lundblad, N. C. Price, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 99–108.
- [15] W. W. You, R. P. Haugland, D. K. Ryan, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1997**, *244*, 277–282.