

Ultrasensitive Detektion von ungefärbten Proteinen in Acrylamidgelen durch native UV Fluoreszenz

Jan Roegerer¹, Petra Lutter², Ralf Reinhardt², Martin Blügge², Dario Anselmetti¹, Helmut E. Meyer^{2,3}

¹Universität Bielefeld, ²Protagen AG, Dortmund, ³Ruhr-Universität Bochum, Medizinisches Proteom-Center, Bochum

Einleitung

► Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) stellt heute immer noch die Technologie dar, die in der Lage ist, bis zu 10.000 Komponenten einer komplexen Proteinmischung zu trennen. Die Detektion und die Quantifizierung der Proteine in der Gelmatrix stellen aber immer noch eine Herausforderung dar. Die derzeit etablierten Färbemethoden haben ihre individuellen Stärken: sie sind entweder empfindlich, schnell, haben einen großen dynamischen Bereich, sind einfach zu handhaben oder kostengünstig. Mit Hilfe der Detektion der nativen Fluoreszenz der aromatischen Seitenketten von Proteinen lassen sich viele Stärken der unterschiedlichen Färbemethoden kombinieren.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) stellt heute immer noch die Trennmethode für Proteomics dar. Diese Methode wurde erstmalig durch Klose und O'Farrell im Jahr 1975 eingeführt^{[1],[2]}. Sie wurde im Laufe der Jahre immer weiter verbessert und ist auch jetzt in ihrer Trennleistung noch unübertroffen. Zusammen mit anderen Techniken wie der Massenspektrometrie hat sie die Entwicklungen und Erfolge in der Proteomanalytik mitgeprägt.

Für eine erfolgreiche Proteomanalyse ist nicht nur eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Proteintrennung sondern auch die quantitative Bildanalyse ein entscheidender Punkt. Nur wenn das Signal der Spots proportional zur Proteinmenge ist, lassen sich zuverlässige Aussagen über Expressionsänderungen treffen. Für die Proteindetektion werden derzeit verschiedene Färbemethoden eingesetzt, die unterschiedliche Vor- und Nachteile haben. Die am häufigsten in der Analyse von 2DE-Gelen eingesetzte Färbemethode ist die Silberfärbung. Sie weist mit ca. 0,5 bis 2 ng je Proteinspot die beste Sensitivität auf, ist aber in der Darstellbarkeit des linearen dynamischen Bereichs auf nur zwei Größenordnungen beschränkt. Bei einer zu hohen Proteinkon-

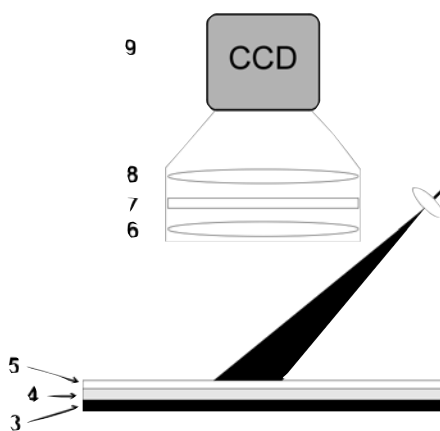


Abb. 1: Experimenteller Aufbau für die UV-Detektion von ungefärbten Proteinen in Acrylamidgelen: (1) UV-Laser, (2) Sphärische Linsen ($f=100$ mm), (3) Stahlplatte, (4) Acrylamidgel, (5) Quarzglasplatte, (6) + (8) Nikon Objektive, (7) Bandpassfilter (300–375 nm), (9) CCD Kamera.

zentration in einem Spot tritt eine Sättigung der Proteinfärbung auf. Solche gesättigten Spots lassen sich nicht mehr quantitativ auswerten. Erschwerend kommt hinzu, dass diese Färbung stark von der Dauer der Färbung und der Temperatur abhängt und somit schwer reproduzierbar ist. Die Färbung mit Coomassie Blue ist bezüglich der Reproduzierbarkeit sehr viel zuverlässiger aber auch bis zu einer Größenordnung weniger sensitiv als die Silberfärbung. Dafür liegt der lineare Bereich bei ca. 50 ng bis 10 µg je Proteinspot. Bei dem Färbeprozess der Silber- oder Coomassie-Färbung, der sich meistens aus mehreren Schritten zusammensetzt, kann ein Verlust von Proteinen durch Auswaschen nicht ausgeschlossen werden. Dieser verringert nicht nur die Sensitivität des Proteinnachweises im Gel, sondern auch die der nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen. Der Zusatz von organischen Lösungsmitteln wie Ethanol und Methanol, die die Proteine in der Gelmatrix fixieren sollen, führt zu einer Modifikation von Aminosäuren in Form von Methylierungen an Asparaginsäure und Glutaminsäure.

In den letzten Jahren haben sich zunehmend Färbemethoden, die auf dem Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen basieren, etabliert. Sie sind in ihrer Nachweisgrenze vergleichbar mit der Silberfärbung, bieten aber Vorteile bezüglich der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse der Proteine, da sie diese nicht modifizieren und auch die Färbedauer gegenüber den anderen Färbemethoden deutlich reduziert ist. Die benötigten Chemikalien und Fluoreszenzscanner sind allerdings teuer. In einem sogenannten Multiplexing-Ansatz können auch Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, die vor der Trennung kovalent an die Proteine gebunden werden. Bei der Verwendung von z.B. zwei Farbstoffen mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen können direkt Unterschiede einzelner Proteine in zwei Zuständen miteinander verglichen werden. In diesen Ansätzen werden beide Proben in einem 2DE-Gel getrennt und so eine maximale Übereinstimmung der relativen Lage der Proteine im 2DE-Gel gewährleistet. Die derzeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe werden kovalent an Lysinseitenketten von Proteinen gebunden. Eine Markierung setzt folglich das Vorhandensein von Lysin in den nachzuweisenden Proteinen voraus. Hierbei kommt es zu einer leichten Verschiebung des isoelektrischen Punkts und des Molekulargewichts dieser Proteine. In der Regel wird aber nur ca. 1 % der Proteine modifiziert und detektiert. Der verbleibende Anteil ist unmodifiziert und kann durch Standardfärbemethoden sichtbar gemacht und für massenspektrometrische Analysen verwendet werden.

Durch den Nachweis mittels nativer Fluoreszenz lassen sich die Stärken vieler Färbemethoden kombinieren. Als Fluorophore dienen die aromatischen Seitenketten von Tyrosin und Tryptophan. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm emittieren sie, abhängig von der lokalen Umgebung, überwiegend im Bereich von 290 nm bis 400 nm^[3].

Der für die Messung der nativen Fluoreszenz erforderliche Aufbau besteht im wesentlichen aus einer UV Quelle (frequenzverdreifachter Ti:SA-Laser, Tsunami, Spectra Physics, USA, mit 150 mW Leistung bei 280 nm) und einer UV-fähigen, sensitiven BCCD Kamera (Dyna Vision, Lavision Biotec, Germany). Ein Filter schränkt den detektierten Spektralbereich auf 300 nm – 375 nm ein. Von dem Gel werden sukzessive 1 cm² große Abschnitte auf die Kamera abgebildet und diese hinterher zu einem Gesamtbild mit einer Auflösung bis zu 1000 dpi zusammengesetzt. Die maximale Probengröße beträgt zur Zeit 100 mm x 100 mm.

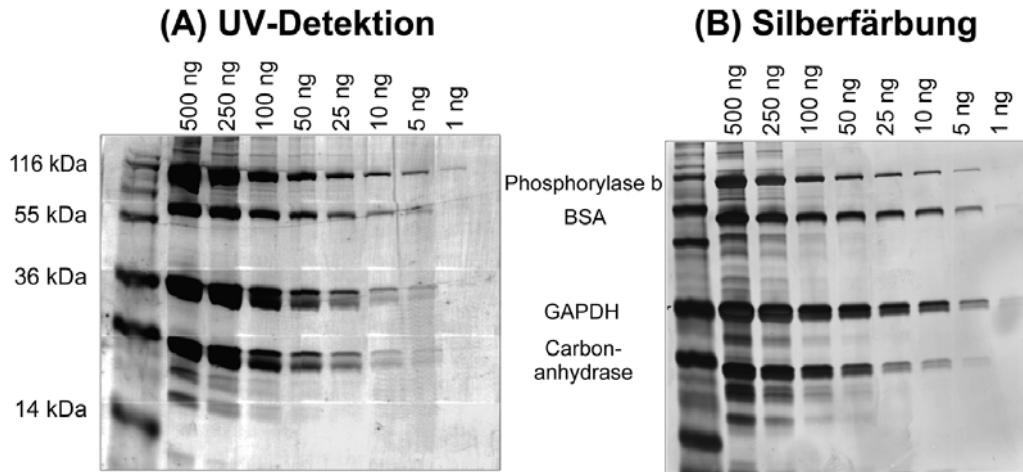


Abb. 2: Gegenüberstellung der UV-Detektion A und Silberfärbung B von Proteinen. Eine Mischung aus vier Proteinen (Carbonanhydrase (29 kDa), GAPDH (36 kDa), BSA (66 kDa) und Phosphorylase b (97,4 kDa)) wurden in einem parallelen Ansatz jeweils in einem 1D-Acrylamidgel separiert und nach der Trennung fixiert. Die Proteine aus Gel A wurden nach UV-Anregung detektiert und die aus Gel B mit Silber gefärbt und anschließend mit einem Durchlichtscanner digitalisiert. Die Proteine wurden in einer Verdünnungsreihe von 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 1 ng je Protein (Bande 2 bis 9; Bande 1: MW-Standard) aufgetragen. Die UV-Anregung erfolgte bei 280 nm mit 35 mJ/cm² [4].

Ergebnisse und Diskussion

Die Nachweisgrenze wurde mit 1 DE-Gelen bestimmt. Für fünf verschiedene Pro-

teine lag sie zwischen 1 ng und 5 ng je Bande. Das ist vergleichbar zur Silberfärbung. Zum besseren Vergleich zu silbergefärbten Gelen sind die Fluoreszenzbilder als Nega-

tiv dargestellt. Die Proteine fluoreszieren heller als das Gel. Die Anzahl der detektierten Spots in 2DE-Gelen (6 x 6 cm, pH 2–11, Trägerampholyt-System nach Klose) war nur geringfügig kleiner als bei einem vergleichbaren silbergefärbten Gel^[4].

Die niedrige Nachweisgrenze war zunächst unerwartet. In einem früheren Experiment bei einer Anregung mit 253 nm lag die Nachweisgrenze mit wenigen µg je Bande drei Größenordnungen höher^[5]. Die Absorption und Quantenausbeute von Tryptophan und Tyrosin liegen wesentlich niedriger als für gute synthetische Farbstoffe. Daraus resultiert ein ca. 100-fach geringeres Fluoreszenzsignal für Tryptophan und sogar ca. 1000-fach geringeres Signal für Tyrosin je Molekül^[6]. Der Vorteil nat-

tiver Fluoreszenz besteht darin, dass alle Moleküle in einem Spot zum Signal beitragen. Bei Färbemethoden wird evtl. nur ein Bruchteil der Moleküle markiert, insbeson-

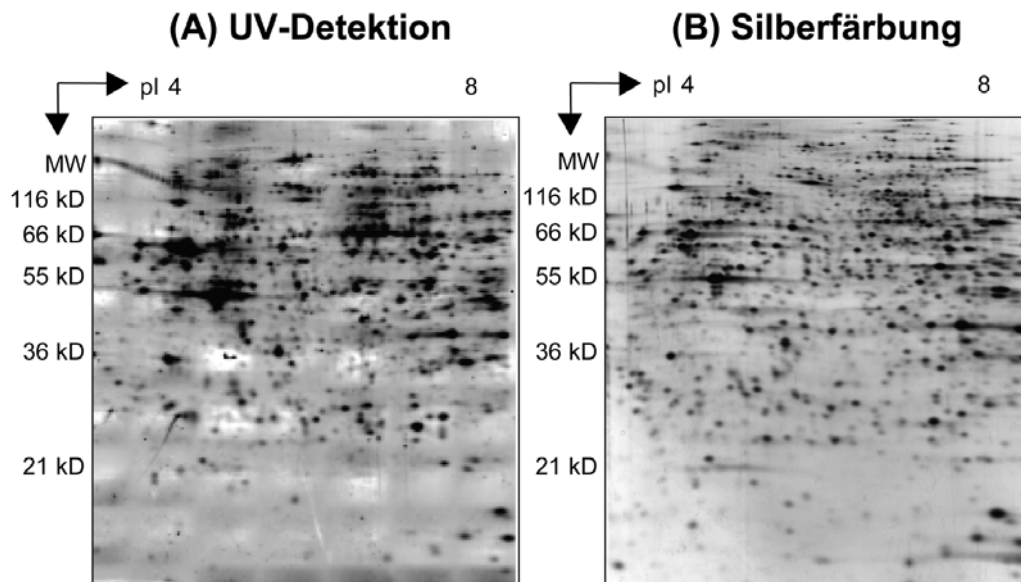


Abb. 3: 2DE-Spotmuster von humanen EA.hy 926-Zelllysaten. Jeweils 20 µg Protein wurden in 2DE-Gelen mit einer Dimension von 6 × 7 cm² (pH 2–11) separiert. (A) UV-Detektion der Proteine in einer inversen Graustufendarstellung (~ 600 Spots). Die UV-Anregung erfolgte bei 280 nm mit 35 mJ/cm². (B) Silbergefärbtes und unter identischen Bedingungen generiertes 2DE-Gel (~ 700 Spots) [4].

dere bei glykosilierten Proteinen ist das Anfärben problematisch. Außerdem gibt es kein unspezifisches Anfärben des Gels, woraus ein niedriges Hintergrundsignal resultiert. So können geringe Proteinmengen noch erkannt werden.

Eine Datenbanksuche (NCBI nr 9.23) mit 1,026,890 Proteinen ergab, dass über 99 % der Moleküle mindestens eine fluoreszierende Aminosäure enthalten und damit prinzipiell durch native Fluoreszenz nachgewiesen werden können. Es wurden in der Suche nur Proteine mit einer Masse über 10 kD berücksichtigt, weil kleinere Proteine in den gebräuchlichen 2DE-Gelen nicht enthalten sind.

Das Signal ist proportional zur Proteinmenge (im Gegensatz zur Silberfärbung) und die Dynamik der Messungen überspannte 2,7 Größenordnungen. Das ist wesentlich mehr als bei Silber- und Coomassiefärbungen und konkurriert mit Standard-Fluoreszenzmethoden. Da auf Färbeschrit-

te verzichtet wird, sollten die Messungen besser reproduzierbar sein als bei bisherigen Methoden und somit den quantitativen Vergleich zweier Gele potentiell zuverlässiger machen.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Detektion nativer Fluoreszenz reduziert den Material- und Zeitaufwand zur Proteindetektion in Gelen. Die Methode kombiniert die Stärken der bisherigen Messmethoden in Bezug auf Nachweisgrenzen, Dynamik, Materialkosten und Arbeitsaufwand. Multiplexing zum Vergleich verschiedener Proben in einem Gel ist mit dieser Methode nicht möglich. Die Proben stehen, aber chemisch unverändert, für weitere Analysen (MS) zur Verfügung. Ziel ist es, den Laser durch eine UV-Lampe zu ersetzen und so ein marktfähiges Produkt zu entwickeln. Desweiteren arbeiten wir daran, die Methode auch auf Proteinmicroarrays anzuwenden.

Literatur

- [1] **Klose, J.** (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26(3): 231–243
- [2] **O'Farrell, P.H.** (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250(10): 4007–4021.
- [3] **Lakowicz, J.R.** (1983): Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Publishing Corporation, New York, 342–344
- [4] **Roegner, J.; Lutter, P.; Reinhardt, R.; Blüggel, M.; Meyer, H. E.; Anselmetti, D.** (2003): Ultrasensitive detection of unstained proteins in acrylamide gels by native UV fluorescence. *Anal. Chem.* 75(1): 157–159
- [5] **Koutny, L.B.; Yeung, E.S.** (1993): On-line detection of proteins in gel electrophoresis by ultra violet absorption and by native fluorescence utilizing a charge-coupled device imaging system. *Anal. Chem.* 65: 183–187
- [6] **Greulich, K. O. in: Lab Manual: RNP Particles, splicing and autoimmune diseases, J. Schenkel (Editor)** 1998, Springer, 48–71. Intrinsic fluorescence techniques for studies on protein-protein and protein-RNA interaction in RNP Particles. ISBN: 3-540-62448-1

Korrespondenzadresse:

Jan Rögner (Diplomphysiker)
 Universität Bielefeld
 Angewandte Laserphysik
 Universitätsstrasse 25 D3
 D-33615 Bielefeld
 Tel.: 0521-106 5440
 Fax: 0521-106 2958
 roegner@physik.uni-bielefeld.de