

Protein-Versuche: Protein-Fingerabdruck

Begriffe wie Genomanalysen oder "**Genomics**" haben mittlerweile Eingang in den normalen Wortschatz erhalten. Hierbei werden Chromosomen verschiedener Organismen (u.a. Mensch) in ihrer Basenabfolge analysiert und katalogisiert. ("**HUGO**"= humanes Genomprojekt).

Diese Gensequenzen sind für die Wissenschaft jedoch so lange nutzlos, bis man ihre Genprodukte - die Proteine - kennt. Aber über das Zusammenspiel verschiedener Proteine in der Zelle, oder darüber, welche Proteine überhaupt exprimiert ("translatiert") werden, sagt "Genomics" nichts aus. Proteine sind die wichtigsten Bausteine des Lebens und übernehmen im Körper viele Funktionen: Enzyme, Membranproteine, Transportproteine, Hormone. Die DNA hat hierbei lediglich die Aufgabe eines Informationsspeichers.

Ein noch schwierigeres Vorhaben als die fast abgeschlossene Entschlüsselung des **Genoms** ist die Entschlüsselung des menschlichen **Proteoms**, der Gesamtheit aller menschlichen Proteine. Bisher sind nur ca. 5000 Proteine (von ca. 500.000) bekannt. Zu diesem Problem hat sich aktuell ein neuer Wissenschaftszweig, die "**Proteomics**" entwickelt. Hierbei wird die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. vor und nach einer Medikamenteneinnahme), unter ganz bestimmten Bedingungen (z.B. Stresseinwirkung) und an einem ganz bestimmten Ort (z.B. einer Tumorzelle) vorhandenen Proteine analysiert. Durch **Vergleich des Protein-Profiles** einer kranken Zelle mit ihrer gesunden Nachbarzelle lassen sich oft erste Hinweise über **Krankheitsursachen** gewinnen. Die Entzifferung der Proteine verspricht also Heilungschancen für viele Krankheiten.

In der **Lebensmittelüberwachung** ist die Bedeutung des Protein-Profiles besonders gewachsen:

Ist in Kalbsleberwurst auch drin, was auf dem Etikett steht? Nicht selten entdeckten Lebensmittelkontrolleure in Rindersalami nur Schweinefleisch oder Hühnerbrühe wurde mit billigerem Putenfleisch gestreckt.

Angesichts der BSE-Gefahren wollen viele Verbraucher sicher sein, dass z.B. kein Rindfleisch in ihrer gekauften Wurstsorte enthalten ist. Auch der Nachweis **gentechnisch veränderter Lebensmittel** erhält in Zukunft große Bedeutung. Transgene Pflanzen mit artfremden Genen enthalten auch neue Proteine. Man wird in Zukunft z.B. gentechnisch veränderte Lebensmittel sehr einfach mit dieser Methode identifizieren können. Dazu wird das Vorhandensein eines Fremdproteins (z.B. eines Selektionsmarkerproteins) oder das Fehlen eines bestimmten endogenen Proteins untersucht.

In der **Evolutionsforschung** spielt der Vergleich der Proteine ebenfalls eine große Rolle: Je ähnlicher die Proteinausstattung z.B. des Blutserums, desto ähnlicher muss auch die zugrundeliegende DNA sein, d.h. je geringer die genetische Distanz, desto enger die Verwandtschaft.

Die Erstellung eines Protein-Fingerabdrucks (z. B. Fleischsorten, Fruchtsäfte, Kartoffelsorten...)

Da die Sequenz und Struktur eines jeden Proteins durch eine spezifische kodierende DNA-Sequenz festgelegt wird, können auch Protein-Fingerprints letztlich Aussagen über die genetische Ausstattung einer Art machen. Ähnlich wie beim DNA-Fingerprinting kann man durch Protein-Fingerprinting also evolutionäre Verwandtschaftsverhältnisse beschreiben.

Um z.B. Lachs, Forelle, Stör, Wels und Zander zu unterscheiden, muss man die verschiedenen Fischmuskelfleisch-Proben in ihrem **Proteinmuster** vergleichen. Muskel-Gewebe besteht überwiegend aus den Proteinen Actin und Myosin - diese Proteinausstattung ist daher bei den verschiedenen Fischarten sehr ähnlich. Viele andere Muskelproteine sind jedoch selbst bei eng verwandten Arten sehr verschieden und dienen in unserem Versuch als arttypischer **Protein-Fingerabdruck**.

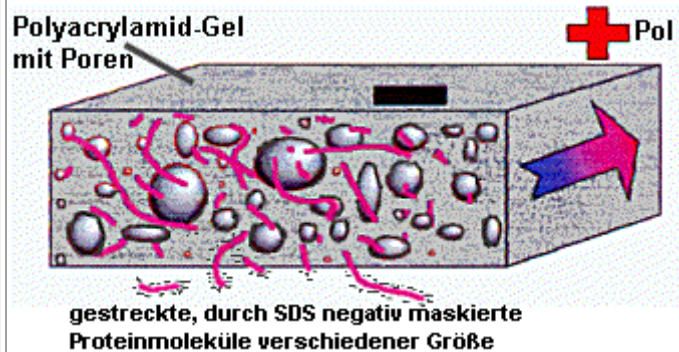
Wie beim DNA-Fingerabdruck wird wieder eine **Sortierung nach der Molekülgröße** vorgenommen. Man lässt die Proteinmoleküle -unzerschnitten, aber hitzedenaturiert- in einem elektrischen Feld durch die Poren eines **Gels** wandern, und erhält wie bei der DNA ein **charakteristisches Bandenmuster**.

In unserem Versuch benutzen wir ein **SDS-Polyacrylamid-Gel**. Es wird benutzt, um ähnlich wie in einem Agarose-Gel Proteingemische nach Molekülgröße zu trennen.

Die von verschiedenen **Fleischsorten** (z.B. Rind, Schwein, Pute) oder Fleischgemischen (z.B. Lyoner, Salami) erhaltenen Protein-Fingerprints werden anhand von bestimmten **typischen Banden** z.B. als Rindfleisch identifiziert.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Gemische verschiedener Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteinproben werden durch Zugabe des starken Detergens (=Seife) **SDS** (Sodiumdodecylsulfat, deutsch: Natriumdodecylsulfat) und anschließendes Erhitzen (95° C) denaturiert. Alle Proteine liegen im Anschluss an diese Behandlung in einer ähnlichen, stäbchenartigen Form vor und sind durch das stark negativ geladene SDS maskiert.



Legt man nach Auftrag der Proben auf das Gel ein elektrisches Feld an, wandern die Proteine zur Anode (+). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine hängt dabei fast nur von ihrem Molekulargewicht ab; ihre Eigenladung ist durch das SDS völlig überdeckt. Das SDS-PAGE kann man sich als eine Art Molekularsieb vorstellen, das aus langen Polymeren des Acrylamids besteht und durch Bisacrylamid quervernetzt wurde. Größere Proteine werden im Geflecht stärker zurückgehalten, wandern also langsamer.

Die zu untersuchende Proteinprobe wird mit **Laemmli-Puffer** versetzt, der neben SDS noch Bromphenolblau enthält, das den Fortlauf der Elektrophorese anzeigt. Bromphenolblau wandert aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften immer vor der Proteinfront. Glycerin als weiterer Bestandteil sorgt durch seine hohe Dichte für einen einfachen Probenauftrag auf das Gel. Trägt man parallel zur Proteinprobe einen Molekulargewichtsstandard (**Proteinmarker**) mit Proteinen bekannter Molekulargewichte auf, kann man über einen Bandenvergleich Molekulargewichte in der Probe grob abschätzen.

SDS-PAGE werden oft angewandt, um Ergebnisse biochemischer Protein-Experimente auswerten zu können oder auch um die Reinheit isolierter Proteine überprüfen zu können.

Um die Trennung der Proteinmoleküle zu verbessern, wird mit 2 verschiedenen großen Porengrößen im Gel gearbeitet: Sammelgel und Trenngel. (s. Durchführung)

Übersicht zum Versuchsablauf:

Material und Chemikalien:		
Thermoblock	Hitzenaturierung	
Stoppuhr	Zentrifuge, Elektrophorese	
Elektrophoreseapparatur	Trennung der Proteine	
Mikropipetten		300µl
Hamiltonpipette	Einfüllen der Proben in die Geltaschen	10µl
Schutzhandschuhe		
Laemmli-Buffer	Lösungsmittel, Denaturierung der Proteine, Farbstoff, Fertiglösung	SDS: $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$
		Bromphenolblau
Laufpuffer: (BioRad)	Tris/Glycin/SDS- Fertiglösung	
Coomassie-Färbelösung (fertig)	Ethanol 40% , Essigsäure7% , Coomassie Brilliant-Blue R250 0,4%, dest. Wasser ad 100%	(Abzug)
Coomassie-Entfärbelösung (fertig)	Ethanol 30% , Essigsäure10% dest. Wasser ad 100%	(Abzug)

Zeitplanung:	Experiment: SDS-PAGE		
Arbeitsschritte			
Proteindenaturierung	A1) – A2)	Pipettieren, Inkubieren	20'
	A3) – A4)	Zentrifugieren, Pipettieren	10'
Gelelektrophorese	B1)	Auftragen der Protein-Proben	15'
	B2)	Elektrophorese	40'
Färben/Entfärben	C1) - C3)	Anfärben der Protein-Banden	20'
		Herauswaschen der Hintergrundfärbung	30'
		Archivierung	20'
Auswertung	D)		5'
Gesamtdauer:			ca. 3,0 h

Durchführung:

A) Herstellung der verschiedenen Protein-Proben

1) Stellen Sie die Proben der verschiedenen Fisch- bzw. Fleischarten bereit. Es genügt eine Menge, die einer Messerspitze entspricht (ca. 100 mg).

Fettbestandteile sollten möglichst entfernt werden, da sie das Laufverhalten der Proteine in der Gelelektrophorese stark beeinträchtigen!

Stellen Sie gegebenenfalls das Eppendorfgefäß mit dem Proteinmarker bereit.

2) Geben Sie zu jeder Fleischprobe **300 µL Laemmlis Sample Buffer**. Zentrifugieren Sie die Gefäße **einige Sekunden**, um das gesamte Material am Boden zu sammeln. Lassen Sie anschließend die Eppendorfgefäße **10 min** bei **95° C** im **Thermoblock** inkubieren.

Zur Vorbereitung der Proben sollten Einmalhandschuhe getragen werden, da die Eppendorf-Gefäße durch die Hitze aufspringen können!

Am besten wird jedes Eppendorf-Gefäß mit der Nadel angestochen, um den entstehenden Wasserdampf entweichen zu lassen. Wenn man die Proben dann nach 10 min in ihrem Gestell vom Thermoblock abnimmt, kann man sie kurz abkühlen lassen.

3) Alle Proben werden **1 min** in der **Zentrifuge** (bei 6000 rpm) zentrifugiert. Der **Überstand** mit dem **denaturierten Proteingemisch** wird anschließend weiterverwendet für die Gelelektrophorese (**siehe Skriptseite 21**) (Bei Bedarf könnten die Proben jetzt zur Aufbewahrung eingefroren werden).

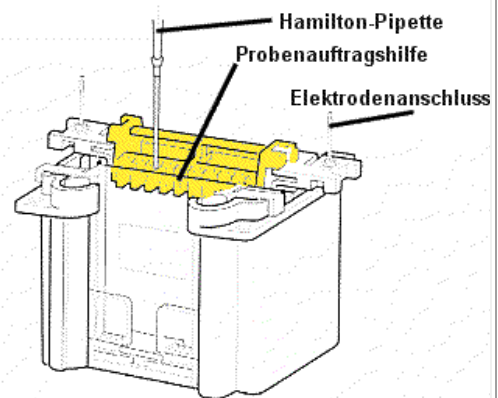
B1) Probenauftrag:

Die **Probenauftragshilfe** wird auf die Apparatur aufgesteckt. Mit einer **Hamiltonspritze** können jetzt die aufbereiteten Proben **vorsichtig** - d.h. ohne aus Versehen einen Teil der Flüssigkeit in Nachbar-Taschen zu bringen - in die Geltaschen aufgetragen werden. Es empfiehlt sich, auf den beiden Platten verschiedene Mengen zu versuchen: **5µL** bzw. **10µL**
Reihenfolge protokollieren: Proteinmarker, Probe A bis X. (Es empfiehlt sich, eine Markierung auf der Geltaschette anzubringen, so dass es bei der Auswertung nicht zu Verwechslungen kommen kann.)

Die Hamiltonpipette nach jeder Probe in der **vorderen Pufferkammer spülen!**

B2) Elektrophorese

Probenauftragshilfe entfernen! Der Deckel wird auf den Pufferbehälter aufgesetzt (Falschpolung ausgeschlossen) und an das Spannungsgerät angeschlossen. Die Elektrophorese wird 40 - 50 min bei 220 V durchgeführt. Die Elektrophorese sollte abgeschaltet werden, wenn die blaue Bromphenolblau-Bande kurz vor dem unteren Gelrand angelangt ist.



C) Färbung

1) Coomassie-Färbelösung:

Alle Bestandteile der Apparatur werden in umgekehrter Reihenfolge wieder auseinandergenommen, bis man die Geltaschette mit dem SDS-Gel vor sich liegen hat. Diese wird unter Zuhilfenahme eines Spatels oder grünen Plastik-Keils **vorsichtig** aufgehebelt und das Gel in die Coomassie-Färbelösung (ca. 100 mL) überführt. (Auch hier ist eine Markierung zur einfacheren Auswertung ratsam. Zum Beispiel kann eine Ecke des Gels abgetrennt werden.) Nachdem die Lösung in der Mikrowelle auf ca. 80° C gebracht wurde, wird für ca. 20 min unter gelegentlichem Schwenken gefärbt.

2) Coomassie-Entfärbelösung:

Anschließend wird der Färber in das Vorratsgefäß zurückgegossen und das Gel mit ca. 100 mL Entfärber erneut in der Mikrowelle erwärmt. Nach ca. 30 - 60 min ist das Ergebnis der SDS-PAGE auf einem Leuchttisch (Tageslichtprojektor) zu erkennen. Ein Austausch der

Entfärbelösung gegen frischen Entfärber beschleunigt den Entfärbvorgang ebenso wie leichtes Schütteln des Behälters.

3) Archivierung

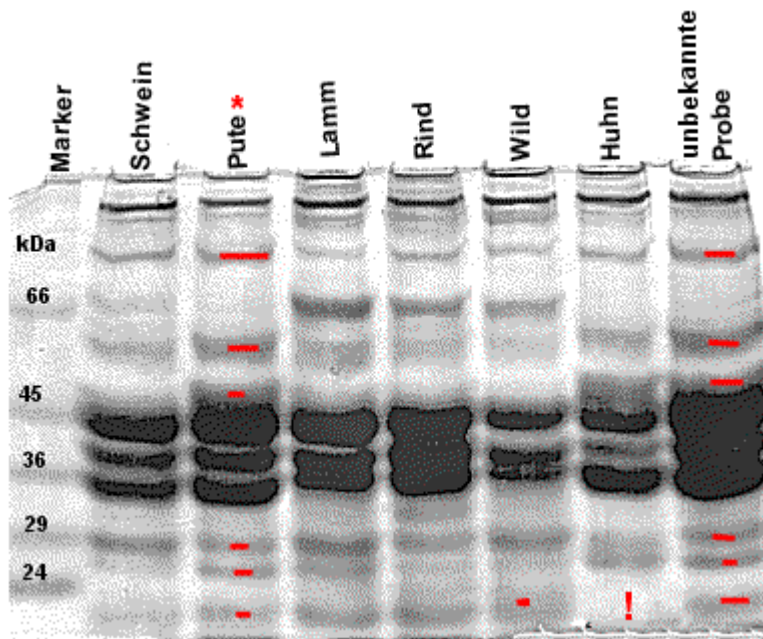
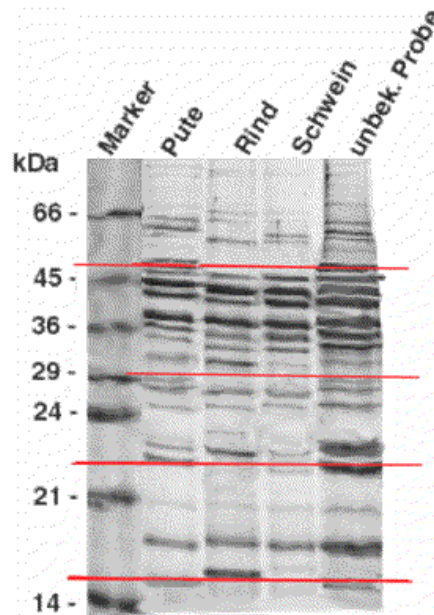
Zur Archivierung wird das Gel ca. 30 min in einer Ethanol/Glycerin-Lösung inkubiert, zwischen zwei in derselben Lösung (angefeuchtete Zellophan-Folien gelegt und in den Trockenrahmen (NOVEX) eingespannt. Das Gel ist nach ca. 12 h getrocknet und kann aus dem Rahmen entnommen werden.

D) Auswertung : "Erstellung eines Proteinfingerabdrucks (hier verschiedene Fleischproben)"

Das Ergebnis des Versuchs "Erstellung eines Proteinfingerabdrucks (z.B. Fisch oder Fleisch)" sollte in etwa so aussehen wie in der Abbildung.

Die zahlreichen Banden, die im SDS-PAGE sichtbar werden sollten, repräsentieren einen Teil der Proteine der untersuchten Fleischproben. Nicht alle Proteine können mit Coomassie angefärbt werden, da die Sensitivität für gering exprimierte (=translatierte) Proteine beschränkt ist.

Man erkennt, dass jede Fleischart (Pute, Rind, Schwein) ein ganz charakteristisches Muster an Proteinbanden zeigt. Bestimmte Banden kommen **nur** in einer der untersuchten Fleischsorten vor und können so auch zur Identifikation von Fleischsorten dienen (siehe "unbekannte Probe"). Auch in Fleischgemischen lässt sich so die Frage beantworten, ob z.B. Rindfleisch enthalten ist. (Vgl. auch Text in der Einleitung zu diesem Versuch).



Schülerzahl:

2 (max. 4) Schülergruppen, da 2 Elektrophorese-Apparaturen mit jeweils max. 2 Gelplatten vorhanden sind.

Lernvoraussetzungen:

Aufbau und Funktion von Proteinen, Proteinbiosynthese

Sicherheit:

Unpolymerisiertes Acrylamid ist giftig! **Schutzhandschuhe, Schutzbrille**