



Coomassie™ Brilliant Blau - Mechanismus von Proteinfärbung und Bradford-Assa

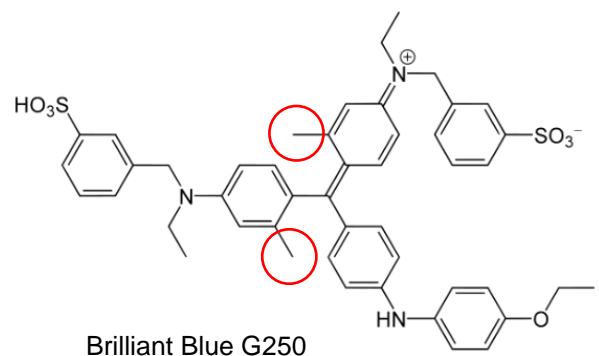
Herkunft

Der Name Coomassie™ wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts als Handelsname des Farbenherstellers Levinstein Ltd. für zwei ähnliche Triphenylmethanfarbstoffe verwendet, die als Säurewollefarbstoffe verwendet werden und leitet sich von der Stadt Coomassie™ (heute Kumasi in Ghana) ab. Die beiden blauen Farbstoffe wurden dann 1913 von Max Weiler mit Sitz in Elberfeld, Deutschland, erstmals hergestellt. Heute ist der Begriff "Coomassie™" eine eingetragene Marke der Imperial Chemical Industries.

Insgesamt gibt es ca. 40 Farbstoffe mit der Bezeichnung "Coomassie™ xy", während nur Coomassie™ G250 und Coomassie™ R250 eine entscheidende Rolle in der biochemischen Analyse spielen. In den letzten Jahren bezeichneten die meisten Autoren diese Farbstoffe jedoch einfach als "Coomassie™", ohne anzugeben, welcher Farbstoff tatsächlich gemeint ist.

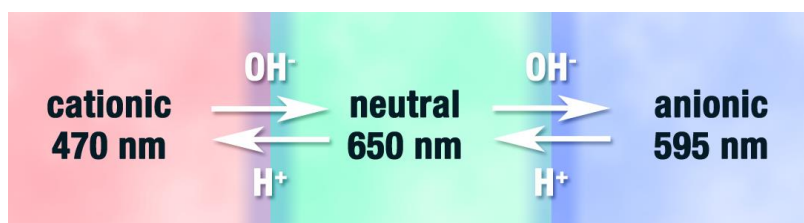
Der Begriff "250" wurde ursprünglich für die Bezeichnung der Reinheit des

Farbstoffs verwendet. Das Suffix 'G' in 'Brilliant Blue G250' wurde hinzugefügt, um die leicht grünliche Farbe des blauen Farbstoffs anzuzeigen. Das Suffix 'R' in 'Brilliant Blue R250' ist eine Abkürzung für "rot", da die blaue Farbe des Farbstoffs eine leichte Rottönung aufweist. Coomassie™ Brilliant Blue G250 unterscheidet sich von Coomassie™ Brilliant Blue R250 durch Addition von zwei Methylgruppen.



Hintergrund der Farbänderung

Die Farbe der beiden Farbstoffe ist abhängig vom Säuregehalt der Lösung und von ihrem Bindungsstatus an Aminosäuren oder Peptide. Bei einem pH-Wert von weniger als 0 hat der Farbstoff eine **rote** Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 470 nm. Bei einem pH-Wert von etwa 1 ist der Farbstoff **grün** mit einem Absorptionsmaximum bei 650 nm, während er oberhalb von pH 2 eine kräftig **blaue** Farbe zeigt mit einem Maximum bei 595 nm.



Die unterschiedlichen Farben ergeben sich aus den unterschiedlich geladenen Zuständen des Farbstoffmoleküls, entsprechend der Menge der positiven Ladungen an den drei vorhandenen Stickstoffatomen, während die beiden Sulfonsäuregruppen normalerweise immer negativ geladen sind.



Guter Rat ist Roth.

Technische Info

- Bei einem pH-Wert von etwa Null sind alle drei Stickstoffatome positiv geladen, so dass der Farbstoff als Kation mit einer Gesamtladung von +1 in der **roten** Form vorliegt.
- In der **grünen** Form (pH ca. 1) zeigt der Farbstoff keine äußere Gesamtladung (+2 und -2).
- Bei einem pH von 2 oder mehr, bis hin zum neutralen pH-Wert, trägt nur ein Stickstoffatom eine positive Ladung und das Farbstoffmolekül liegt in anionischer, **blauer** Form vor mit einer Gesamtladung von -1.
- Unter alkalischen Bedingungen geht das endgültige Proton verloren und der Farbstoff wird **pink**. Dieser Zustand ist jedoch in biochemischen Assays nicht relevant.

Mechanismus der Gelfärbung

Die Darstellung von Proteinen durch Coomassie™ Brilliant Blue R250 wurde erstmals 1963 von Fazekas de St. Groth und Kollegen durchgeführt (Fazekas de *et al.* (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 71:377-91). Zwei Jahre später verwendeten Meyer und Lambert Coomassie™ Brilliant Blue R250, um Proteine in einem Polyacrylamidgel zu färben (Meyer und Lambert (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 107:144-5).

Coomassie™ Brilliant Blue bildet starke, aber nicht-kovalente Komplexe mit Proteinen, die höchstwahrscheinlich auf einer Kombination von van der Waals-Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen basieren.

Die Bildung des Protein-Farbstoff-Komplexes stabilisiert die negativ geladene anionische Form des Farbstoffs und erzeugt die blaue Farbe, die dann auf der Membran oder im Gel zu sehen ist. Die gebundene Anzahl der Farbstoffmoleküle ist ungefähr proportional zur Menge des pro Bande vorhandenen Proteins.

Die Bindung der Coomassie™-Farbstoffe an basische Aminosäuren ist jedoch wesentlich effizienter als saure Aminosäuren; dieser Effekt kann zu leichten Unterschieden bei der Färbung von Proteinen in Gelen führen. Bei der Verwendung von Standardfärbungen muss die Gelmatrix anschließend entfärbt werden, um Proteinbanden darzustellen.

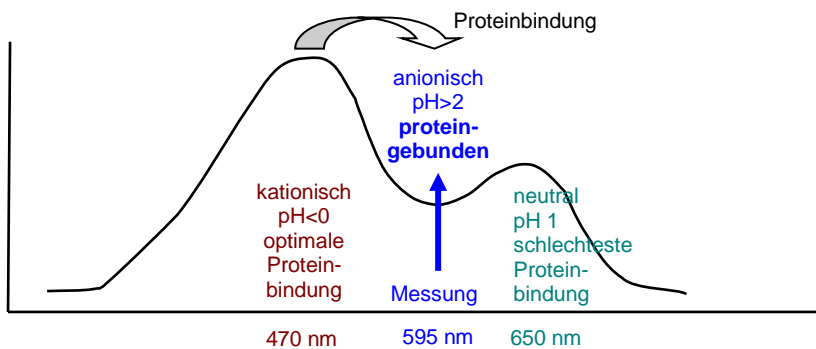
Moderne Gelfärbelösungen verwenden eine kolloidale Form des G-Farbstoffs in phosphorsäurehaltigen Lösungen (z.B. ROTI®Blue, Art. Nr. A152), um die Notwendigkeit der Entfärbung des Gels zu vermeiden (Diezel *et al.* (1972) *Anal. Biochem.* 48:617-20).

Mechanismus des Bradford Assays

Wie bereits erwähnt, binden die Farbstoffmoleküle an Proteine und bilden einen Protein-Farbstoff-Komplex. Der Bradford-Assay verwendet die spektralen Eigenschaften von Coomassie Brilliant Blue G250, um die Menge an Protein in einer Lösung zu ermitteln (Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72:248-54).

In Bradford-Lösungen wird der Farbstoff in roter oder grünlicher Form auf einem niedrigen pH-Wert gehalten; durch diese Mischung sieht die Bradford-Lösung selbst braun aus.

Technische Info



Auch hier stabilisiert die Bildung des Protein-Farbstoff-Komplexes die negativ geladene anionische Form des Farbstoffs, der die blaue Farbe erzeugt. Die optische Absorption der Lösung wird bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. So können unter Standardbedingungen (Proteine in PBS oder anderen niedrig konzentrierten Salzlösungen) hochlineare Standardkurven erzeugt werden.

Dieser Prozess wird jedoch durch mehrere vermeintliche Faktoren verändert. Die Bindung der Coomassie™-Farbstoffe an basische Aminosäuren ist wesentlich effizienter als an saure Aminosäuren. So kann die Messung von Proteinen mit identischen Konzentrationen, aber signifikant unterschiedlichen Mengen an basischen Aminosäuren zu unterschiedlichen Daten führen.

Weiterhin wird die Bindung an die Aminosäuren selbst sowie die Stabilisierung der kationischen, sauren Form durch mehrere Reagenzien, die im Assay vorhanden sein können, wie Detergenzien, biologische Puffer, Zucker etc. behindert. Der Farbstoff bildet auch mit dem anionischen Waschmittel Natriumdodecylsulfat einen Komplex, der die neutrale grüne Form des Farbstoffs stabilisiert. Diese Prozesse führen zu einer Signalverschiebung während der Messung, die eine zuverlässige Analyse der Daten völlig unmöglich machen kann.

