

Gelfärbung von Proteinen

Gelfärbelösungen

ROTH bietet eine große Auswahl an hochwertigen Färbekits und Reagenzien für Proteine - mit unterschiedlicher Sensitivität und für verschiedene Anwendungsbereiche. Die untenstehende Tabelle hilft Ihnen bei der Auswahl der für Ihre Anwendung am besten geeigneten Färbemethode.

Übersicht: Färbung von Proteinen in Gelen

Färbung	Best. Nr.	Sensitivität	Beschreibung
ROTI®Black	L533	1 ng/mm ²	Silberfärbungskit. Hoch sensitiv. Einfach, schnell und reproduzierbar.
ROTI®Blue	A152	10 ng/mm ²	Lösung für kolloidale Coomassie-Färbung von Proteinen. Entfärben nicht erforderlich. Protein-Gelelution möglich ohne zusätzliche Fixierung. Geeignet für Proteomik.
ROTI®Blue quick	4829	10 ng/mm ²	Lösung für schnelle, hochspezifische Proteinfärbung. Entfärben nicht erforderlich. Färbung ohne zusätzliche Fixierung. Geeignet für Blotting und Proteomik.
ROTIPHORESE®Blue R	3074	50 ng/mm ²	Konzentrat zur Coomassie-Färbung.

Technische Info

Färbung	Sensitivität	Schnelle Gelanalyse	Gel-Trocknung	Elution / Transfer	2D-Gele	MS-Analyse
ROTI®Black P	1 ng/mm ²	-	+++	-	+++	-
ROTI®Blue	10 ng/mm ²	-	+++	+++	-	+++
ROTI®Blue quick	10 ng/mm ²	+++	+++	++	-	++
ROTIPHO-RESE®Blue R	50 ng/mm ²	+++	+	-	-	-

+++ : empfohlen

+ : passend

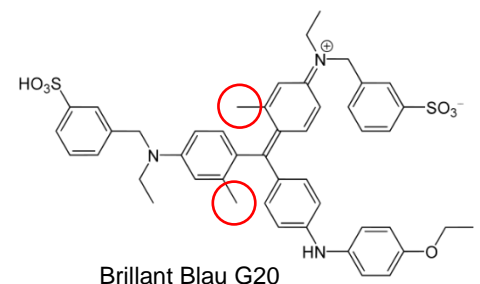
- : nicht empfohlen

Coomassie™ Brilliant Blau

Der Name Coomassie™ wurde erstmals im späten 19. Jahrhundert verwendet und von der Stadt Coomassie übernommen (heute Kumasi in Ghana). Es war ein Handelsname des Farbstoffherstellers Levinstein Ltd. für zwei ähnliche Triphenylmethanfarbstoffe, die als saure Wollfarbstoffe verwendet wurden. Die beiden blauen Farbstoffe wurden dann erstmals 1913 von Max Weiler aus Elberfeld hergestellt. Heute ist die Bezeichnung 'Coomassie™' ein eingetragenes Warenzeichen von Imperial Chemical Industries (ICI).

Insgesamt gibt es ca. 40 Farbstoffe, die 'Coomassie™ xy' genannt werden, wobei nur Coomassie™ G 250 und Coomassie™ R 250 eine entscheidende Rolle in biochemischen Analysen spielen. In den letzten Jahren haben die meisten Autoren diese Farbstoffe jedoch einfach als 'Coomassie™' bezeichnet, ohne zu spezifizieren, welcher Farbstoff tatsächlich gemeint ist.

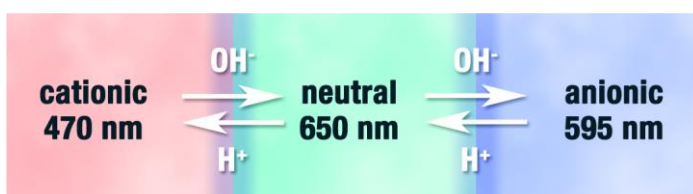
Der Begriff '250' wurde ursprünglich zur Bezeichnung der Reinheit des Farbstoffs verwendet. Der Zusatz 'G' in 'Brillant Blau G 250' wurde hinzugefügt, um die leicht grünliche Farbe des blauen Farbstoffs zu beschreiben. Der Zusatz 'R' in 'Brillant Blau R 250' ist eine Abkürzung für "rot", da die blaue Farbe des Farbstoffs einen leichten rötlichen Farbton hat. Coomassie™ Brillant Blau G 250 unterscheidet sich von Coomassie™ Brillant Blau R 250 durch die Addition von zwei Methylgruppen.



Hintergrund der Farbabweichungen

Die Farbe der beiden Farbstoffe hängt von der Azidität der Lösung ab und von ihrer Bindung an Aminosäuren oder Peptide. Bei einem pH-Wert von weniger als 0 hat der Farbstoff eine **rote** Farbe und ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Liegt der pH-Wert bei etwa 1 ist der Farbstoff **grün** und hat ein Absorptionsmaximum bei 620 nm. Oberhalb von pH 2 ist der Farbstoff strahlend **blau** und hat ein Maximum bei 595 nm.

Die unterschiedlichen Farben ergeben sich aus den verschiedenen Ladezuständen des Farbstoffmoleküls, je nach Anzahl der positiven Ladungen an den drei vorhandenen Stickstoffatomen. Die beiden Sulfonsäure-Gruppen dagegen sind normalerweise immer negativ geladen.





Guter Rat ist Roth.

Technische Info

- Bei einem pH-Wert von etwa 0 sind alle drei Stickstoffatome positiv geladen, so dass der Farbstoff ein Kation ist mit einer Gesamtladung von +1, die in der **roten** Form vorliegt.
- In der **grünen** Form (pH-Wert von ca. 1) hat der Farbstoff keine Nettogesamtladung (+2 und -2).
- Bei pH-Werten von 2 und mehr, bis zum neutralen pH-Wert, trägt nur ein Stickstoffatom eine positive Ladung, und das Farbstoffmolekül ist ein **blaues** Anion mit einer Gesamtladung von -1.
- Unter alkalischen Bedingungen geht das letzte Proton verloren, und der Farbstoff färbt sich **pink**. Dieser Zustand ist jedoch bei biochemischen Assays ohne Bedeutung.

Mechanismus der Gel-Färbung

Die Darstellung von Proteinen mit Coomassie™ Brillant Blau R 250 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™ Brillant Blau R 250, um Proteine in einem Polyacrylamid-Gel anzufärben (Meyer und Lambert (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 107:144-5).

Coomassie™ Brillant Blau bildet starke, aber nicht kovalente Komplexe mit Proteinen, höchstwahrscheinlich basierend auf einer Kombination von van-der-Waals-Kräften und elektrostatischen Wechselwirkungen. 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 Anzahl der gebundenen Farbstoffmoleküle ist ungefähr proportional zur Menge des vorhandenen Proteins pro Bande. Allerdings ist die Bindung der Coomassie™-Farbstoffe an basische Aminosäuren wesentlich effizienter als an saure Aminosäuren; dieser Effekt kann leichte Unterschiede in der Färbung von Proteinen in Gelen verursachen. Bei der Standardfärbung muss die Gelmatrix anschließend gefärbt werden, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

Moderne Gelfärbelösungen verwenden eine kolloidale Form des 'G'-Farbstoffes in phosphorsäurehaltigen Lösungen (z.B. ROTI®Blue, Best.-Nr. A152), wodurch eine Färbung der Gele ohne anschließendes Entfärben möglich wird (Diezel *et al.* (1972) *Anal. Biochem.* 48:617-20).

Die Gelfärbelösungen ROTI®Blue, ROTIPHORESE®Blau R and ROTI®Blue quick basieren auf diesem Farbstoff.

ed 11/2020