

Versuch 1

Aminosäure- und Proteinbestimmungen

Protokollant: *Max Mustermann*
E-mail: *max@mustermann.de*
Studiengang: *Chemie*
Gruppen-Nr: *X*
Semester: *X*
Betreuer: *Prof. Dr. Schäfer*

Aminosäure und Proteinbestimmungen

In den Versuchen a), b) und c) wird die Konzentration an Protein (bzw. einer AS bei Versuch c)) in einer wässrigen Lösung bestimmt. Hierzu werden colorimetrische Methoden verwendet.

Die Proteine (AS) reagieren mit speziellen Stoffen unter Bildung von farbigen und löslichen Produkten, deren Menge in der Lösung direkt proportional ist zu der Ausgangskonzentration an Protein (AS).

Die Konzentrationen der Farbstoffe in den Lösungen werden photometrisch bestimmt.

Photometrie

Ein Photometer strahlt monochromatisches Licht durch eine Probe. Als Wellenlänge λ des Lichts wird diejenige gewählt, bei der der zu bestimmende Stoff sein Absorptionsmaximum hat (bzw. im Versuch die Nächstliegende für die ein Filter verfügbar war). Die Anfangsintensität des Lichts (I_0) wird mit der Intensität des Lichts nach Durchleuchtung der Probe (I) in Verhältnis gesetzt. (I ist der Teil des Lichts, der nicht von der Probe absorbiert wurde.)

$$I / I_0 = T = \text{Transmission}$$

$$\text{Log}(1 / T) = E = \text{Extinktion}$$

Die Extinktion E (ein Maß für die Absorption der Lsg.) wird an einer Skala auf dem Photometer angezeigt und ist direkt proportional (lineare Funktion) zur Konzentration an Farbstoff (und somit auch an Protein) in der Lösung.

Nach dem *Lambert - Beer'schen Gesetz* ist die Extinktion:

$$E = c \cdot d \cdot \epsilon$$

(c = Konzentration, d = die zu durchquerende Schichtdicke, ϵ = Extinktionskoeffizient)
Da d und ϵ gleich bleiben, erhöht sich die Extinktion, direkt proportional zu Konzentration des Farbstoffs (und somit auch an Protein) in der Lösung.

$$c = E / (d \cdot \epsilon)$$

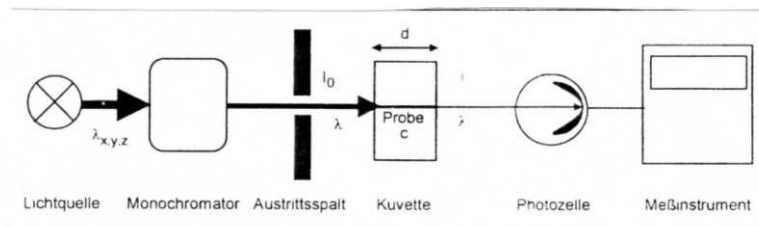


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Photometers

Versuchsteil a): Proteinbestimmung mit Biuret-Reagenz

1.1 Einleitung

Das Ziel des Versuchs ist es, nach Aufstellen einer Eichgerade (wird bestimmt durch photometrische Messung von Proteinlösungen mit bekannten Konzentrationen), die Konzentration zweier unbekannter Caseinlösungen zu bestimmen. Dazu bedienen wir uns der Biuret-Reagenz. Diese Reagenz färbt sich proportional zu der Proteinkonzentration der Lösung.

Biuret-Reaktion

Der Name dieser Reaktion beruht auf einer Farbreaktion zwischen gelösten Biuret (Carbamoylharnstoff: bildet sich leicht beim trockenen Erhitzen von Harnstoff unter Abscheidung von Ammoniak (Abb.2)) und gelöstem Kupfersulfat in wässriger, alkalischer Lösung. Bei dieser Reaktion entsteht ein rotvioletter Farbkomplex zwischen einem Cu^{2+} und 2 Biuret Molekülen (Abb.3).

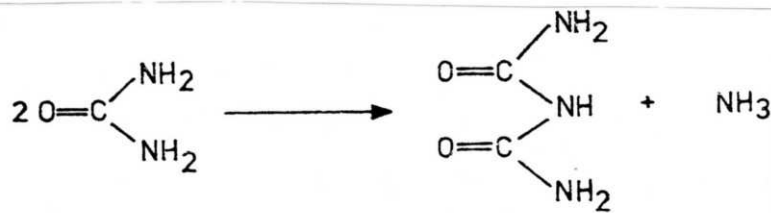


Abb.2: Biuret entsteht beim trockenen Erhitzen von Harnstoff

Dieses Prinzip wird auch bei der Proteinbestimmung angewandt. Hier ersetzen die Peptidbindungen das Biuret. Die Biuret-Reaktion ist spezifisch für alle Substanzen mit zwei oder mehr Peptidbindungen (Dipeptide und Aminosäuren reagieren nicht). In den Proteinen wird mit dieser Reaktion somit die Konzentration an Peptidbindungen (geknüpft zwischen der α -Carboxylgruppe und der α -Aminogruppe zweier AS) gemessen. Biuret-positive Substanzen (z.B. Proteine) ergeben mit Cu^{2+} -Salzen in alkalischer Lösung (unter Zusatz von Wein- oder Zitronensäure) einen rot- bis blauvioletten Farbkomplex (Abb.4), dessen Farbintensität bei 540nm photometrisch bestimmt werden kann.

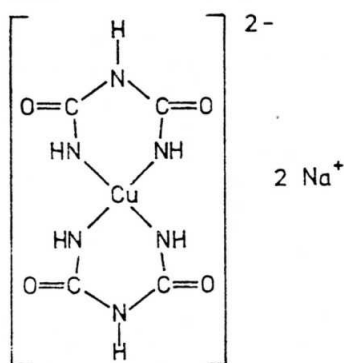


Abb.3: Biuret + Cu^{2+}

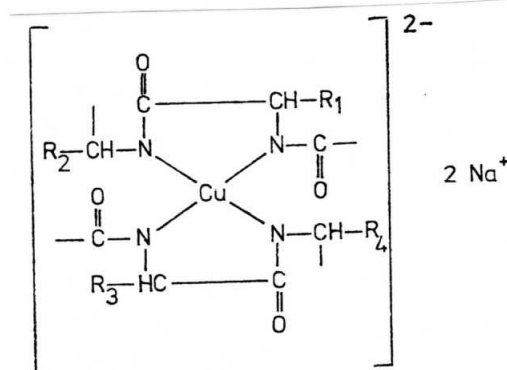


Abb.4: Peptide + Cu^{2+}

Aus der Struktur des Komplexes ergibt sich, dass bei Einsatz verschiedener Proteine nur eine sehr geringe Variation in der Farbintensität auftreten kann. Allerdings ist die Empfindlichkeit der Reaktion gering. Für eine Bestimmung werden 1-10mg/mL Protein benötigt. Günstig dagegen ist die hohe Spezifität der Reaktion. Neben Proteinen werden lediglich Peptide erfasst, ein Umstand den man z.B. für ihren Nachweis nach chromatographischen Auftrennungen nutzt. Die Biuret-Reaktion ist lediglich bei Anwesenheit von Ammoniumionen, die tiefblau gefärbte Cu-Tetramin-Komplexe bilden, nicht einsetzbar. Proteinbestimmungen in Ammoniumsulfathaltigen Proteinfractionen, die im Rahmen von Anreicherungsexperimenten anfallen, dürfen somit nicht mit dieser Methode durchgeführt werden.

1.2 Material und Methode

Die in diesem Versuchsteil zu benutzenden Materialien sind im Skript auf Seite 3 im Teil a) unter Reagenzien angegeben.

Zum Verfahren der Photometrie siehe oben. Die Photometrie wurde in 2cm Küvetten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 546\text{nm}$ durchgeführt ($\lambda_{\text{max}} = 540\text{nm}$).

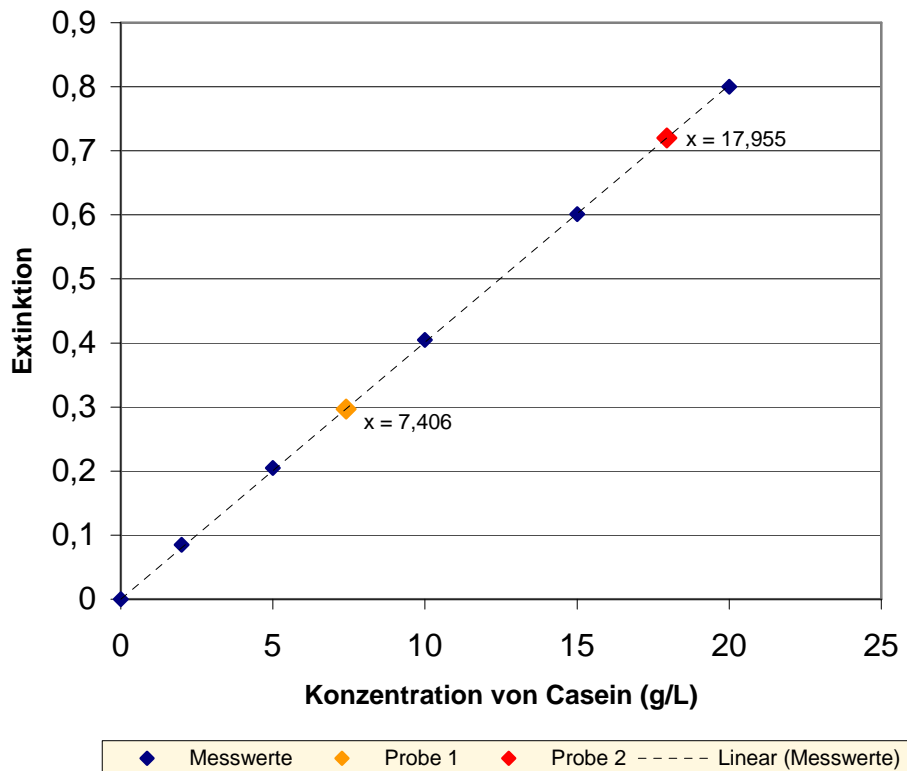
1.3 Versuchsdurchführung

Siehe Skript Seite 3 im Teil a)

1.4 Versuchsergebnisse

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Probe1	Probe2
<i>Casein-Konzentration in g/L</i>	0	2	5	10	15	20	7,406	17,955
<i>Extinktion</i>	0	0,068	0,205	0,405	0,601	0,800	0,297	0,72

Casein-Bestimmung



Die Funktion der Eichgeraden ist: $y = 0,0401x$

Versuchsteil b): Proteinbestimmung nach Lowry

2.1 Einleitung

Das Ziel des Versuchs ist es, nach Aufstellen einer Eichgerade (wird bestimmt durch photometrische Messung von Proteinlösungen mit bekannten Konzentrationen), die Konzentration zweier unbekannter Lysozymlösungen zu bestimmen (Lysozym = Enzym, welches bestimmte Bakterien auflöst, indem es deren Zellwand spaltet. Lysozym kommt in Eiern, im Nasensekret und in der Tränenflüssigkeit vermehrt vor.) Diesmal verwenden wir zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration die Lowry-Methode.

Lowry-Methode

Basis dieser sehr häufig eingesetzten Proteinbestimmungsmethode ist die Molybdänblau-Reaktion. Diese beruht auf der Reduktion sechswertigen Molybdäns (eingesetzt als Molybdat) in den vierwertigen Zustand, wobei dieser als kolloidal gelöstes Mischoxid ($\text{MoO}_2 + \text{MoO}_3$) definiert ist.

Voraussetzung für diese Reaktion ist allerdings, dass das Molybdat als Heteropolysäure – z.B. gebunden im Phosphatrest – vorliegt. Als Reduktionsmittel eignen sich viele anorganische und organische Substanzen. Nachdem die Reaktion

u.a. zur quantitativen Bestimmung von Phenolen eingesetzt wurde, lag es durchaus nahe, sie auch zur Erfassung von Proteinen zu nutzen. Neben Tyrosin und Tryptophan werden Histidin- und Cysteinreste erfasst.

Überführt man die Polypeptidketten durch Zugabe von Cu^{2+} -Ionen in die Biuret-Komplexe, erhöht sich die Empfindlichkeit der Molybdänblaureaktion um ein Mehrfaches und eignet sich nunmehr für eine empfindliche (5 bis $50\mu\text{g}$) Proteinbestimmung.

Der hohen Empfindlichkeit steht leider eine beträchtliche Störanfälligkeit gegenüber. Störung durch alle reduzierend wirkenden Substanzen und z.B. auch Lipide, Komplexbildner, Detergenzien, Polysaccharide und viele anorganische Salze (bereits bei Konzentrationen im millimolaren Bereich).

2.2 Material und Methode

Die in diesem Versuchsteil zu benutzenden Materialien sind im Skript auf Seite 3 im Teil b) unter Reagenzien angegeben.

Zum Verfahren der Photometrie siehe oben. Die Photometrie wurde in 2cm Küvetten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 578\text{nm}$ durchgeführt ($\lambda_{\text{max}} = 660\text{nm}$).

2.3 Versuchsdurchführung

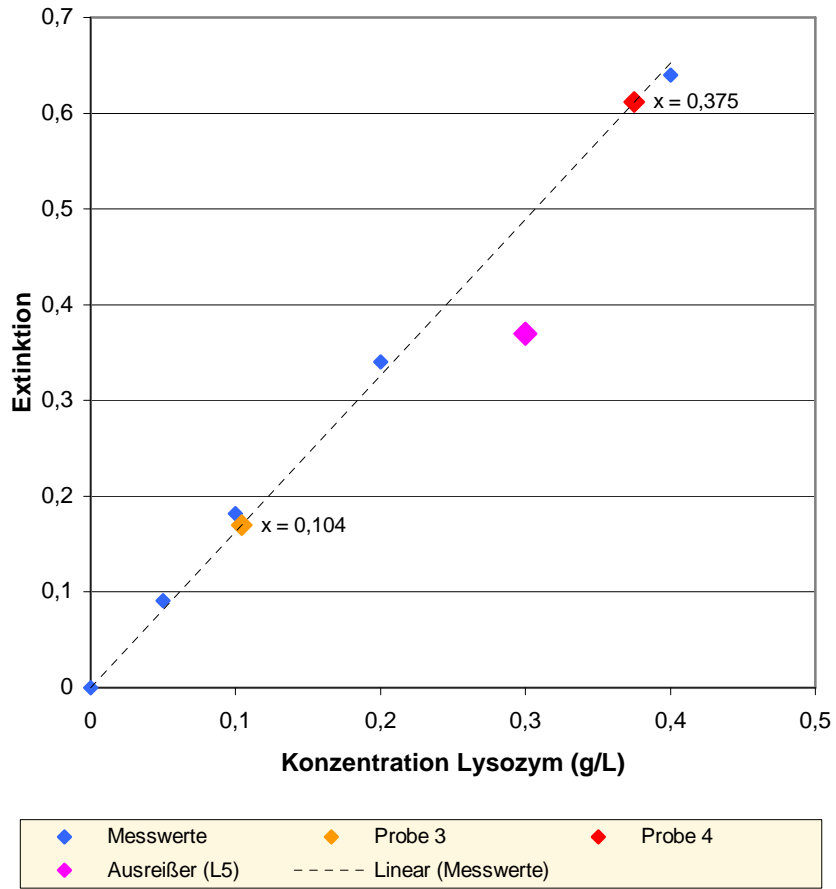
siehe Skript Seite 4 im Teil b)

2.4 Versuchsergebnisse

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Probe3	Probe4
<i>Lysozym-Konzentration in g/L</i>	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,104	0,375
<i>Extinktion</i>	0	0,091	0,182	0,340	0,370	0,640	0,170	0,612

(Das Wertepaar L5 wurde nicht berücksichtigt, da die Extinktion abweicht was auf einen Messfehler schließen lässt.)

Lysozym-Bestimmung



Funktion Eichgeraden ist: $y = 1,6318x$

Versuchsteil c): Aminosäurebestimmung mit Ninhydrin

3.1 Einleitung

Das Ziel des Versuchs ist es wieder, nach Aufstellen einer Eichgerade (wird bestimmt durch photometrische Messung von Glycinlösungen mit bekannten Konzentrationen), die Konzentration zweier unbekannter diesmal Glycinlösungen zu bestimmen. Dazu bedienen wir uns des Ninhydrin.

Ninhydrin

Auf Grund ihres gleichartigen Aufbaus lassen sich alle Aminosäuren (außer Prolin und Hydroxyprolin) mittels einer Reihe von Reaktionen qualitativ und quantitativ bestimmen. Die Ninhydrinreaktion ist die wohl bekannteste und gebräuchlichste Nachweis- und Bestimmungsmethode für Aminosäuren.

Aminosäuren werden in Gegenwart von Ninhydrin beim Kochen oxidativ desaminiert und decarboxyliert. Ninhydrin wird dabei in äquivalenten Mengen zum Hydrindantin reduziert, die Aminosäuren in den um ein C-Atom ärmeren Aldehyd verwandelt. NH_3 und CO_2 werden frei. Hieran schließt sich eine Kondensation von je einem Molekül Ninhydrin, Hydrindantin und NH_3 zu einem typisch rot-blauvioletten Farbstoff an. Die Farbintensität ist proportional zur Aminosäurekonzentration.

Die Ninhydrin-Reaktion ist jedoch äußerst unspezifisch, da auch Proteine und deren Derivate mit Ninhydrin positiv reagieren.

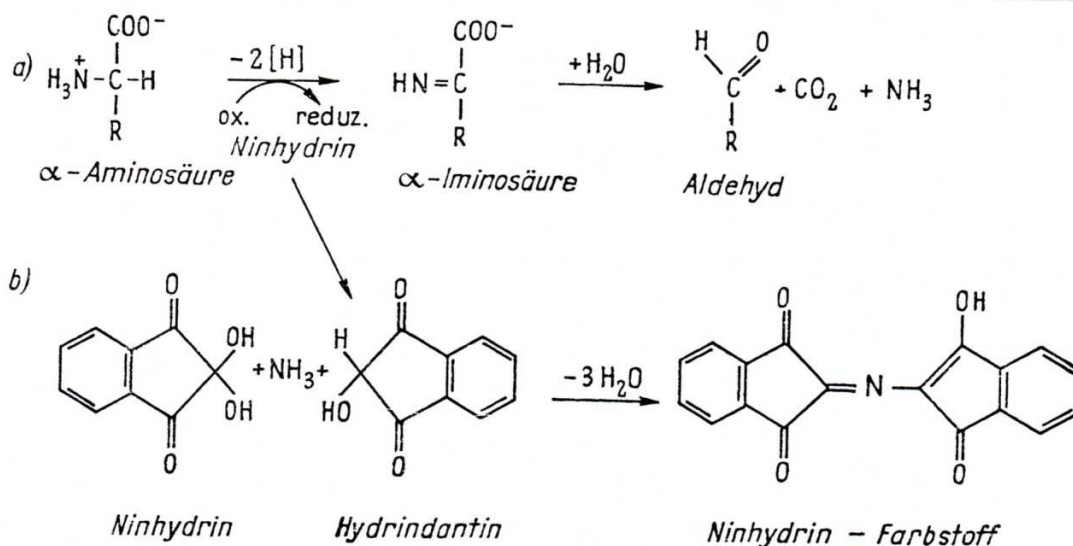


Abb.5: Ninhydrin-Reaktion

3.2 Material und Methode

Die in diesem Versuchsteil zu benutzenden Materialien sind im Skript auf Seite 4 im Teil c) unter Reagenzien angegeben.

Zum Verfahren der Photometrie siehe oben. Die Photometrie wurde in 1cm Küvetten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 578\text{nm}$ durchgeführt ($\lambda_{\text{max}} = 570\text{nm}$).

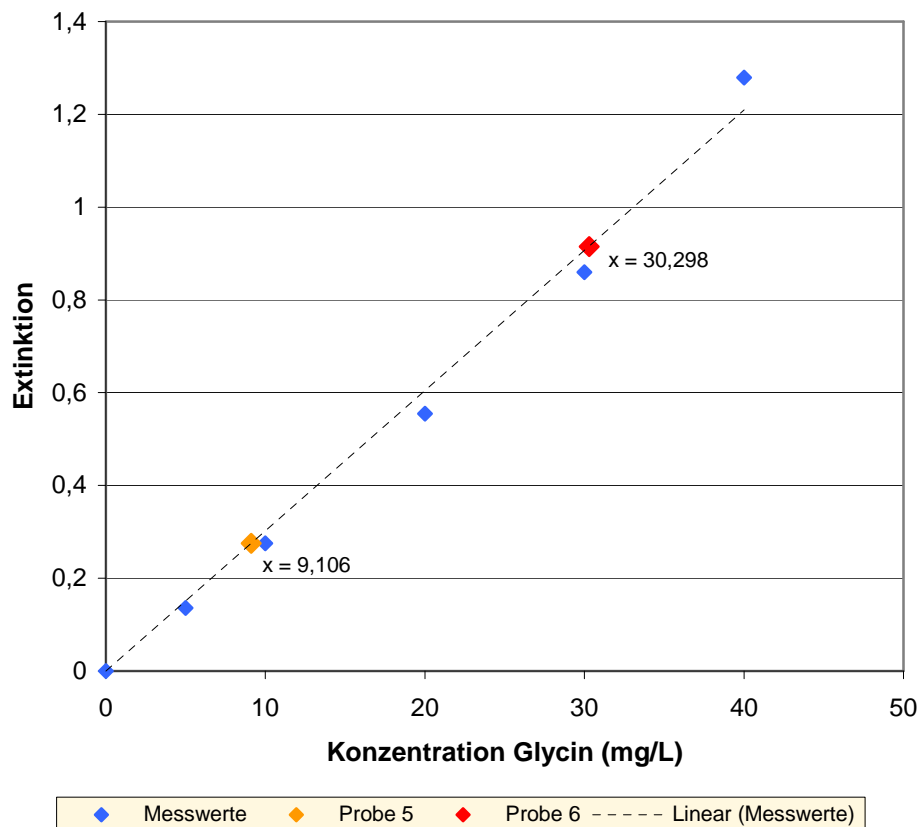
3.3 Versuchsdurchführung

siehe Skript Seite 5 im Teil c)

3.4 Versuchsergebnisse

	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Probe5	Probe6
Glycin-Konzentration in mg/L	0	5	10	20	30	40	9,105	30,298
Extinktion	0	0,136	0,275	0,555	0,86	1,279	0,275	0,915

Glycin-Bestimmung



Funktion der Eichgeraden ist: $y = 0,0302x$

Diskussion

Bei Versuchsteil a) lagen die gemessenen Werte der Proben B1 – B6 alle auf einer Geraden. Das zeigt, dass die Biuret Methode trotz ihrer geringen Empfindlichkeit sehr gut reproduzierbar ist, wenn man die empfohlene Konzentration einhält (1-10 g/L).

Bei Versuchsteil b) wichen die Messwerte der Proben L1 – L6 von der Eichgeraden ab. (Probe L5 sehr stark, wahrscheinlich Pipettierfehler) Dies kommt wahrscheinlich durch die hohe Störanfälligkeit dieser Methode zustande. In Lehrbüchern wird diese Methode auch als schlecht reproduzierbare Methode beschrieben.

Bei Versuchsteil c) liegen die Messwerte auch nicht schön auf der Eichgeraden. Der Grund dafür könnten Verunreinigungen in der Glycinlösung sein – Ninhydrin reagiert auch mit Proteinen und deren Derivaten. Es wurde schon mit sehr geringer Konzentration gearbeitet, so dass eine kleine Verunreinigung dann einen größeren Anteil an der reaktionsfähigen Fraktion der Lösung ausmacht.

Nachtrag zur Versuchsdurchführung: Alle Extinktionen wurden am Photometer gegen den jeweiligen Reagenzienleerwert gemessen (d.h. Extinktion der Reagenzien, ohne Protein, wurde als Nullwert genommen). Deswegen verläuft die Eichgerade auch direkt durch den Ursprung des Koordinatensystems.

Literatur

- Skript zum Biochemischen Grundpraktikum*, Institut für Biochemie, J.-G.-Universität-Mainz
- Biochemisches Praktikum*, Kleber, Schlee, Schöpp, Verlag: Gustav Fischer, 1997
- Biochemie*, Stryer, Verlag: Spektrum, 1994 (2. durchgesehene Auflage)
- Biochemisches Praktikum*, H.Gräser, Verlag: Vieweg, C.F. Winter, 1971
- Praktische Biochemie*, Klaus Klein, Verlag: Quelle & Meyer, 1975