

Nachweis und Identifizierung von Proteinen

Versuch 1: Biuret-Nachweis

Materialien

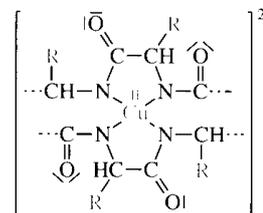
Verdünnte CuSO_4 -Lösung, Eiklar, konz NaOH (Schutzbrille!), Reagenzglas im Ständer, Spatel, Gasbrenner mit Feuerzeug.

Durchführung

Etwas Eiklarlösung wird zunächst mit wenigen Tropfen konz NaOH und dann mit wenigen Tropfen verdünnter CuSO_4 -Lösung versehen. Evtl. vorsichtig (!) erwärmen.

Erklärung

Mit Cu^{2+} -Ionen in stark basischer Lösung bilden **deprotonierte** Peptid-Bindungen den violetten **Biuret-Komplex** (siehe rechts)



Aufgabe

Beim Fehling-Test tritt der intensiv blaue Natrium-Ditartratocuprat-II-Komplex $\text{Na}_2^+[\text{Cu}^{2+}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)^{2-}]$ auf. Tartrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$) ist der Säurerest der Weinsäure $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$. Zeichnen Sie die Strukturformeln der Weinsäure, des Tartrates und des Natrium-Ditartratocuprat-II-Komplexes in Analogie zum Biuret-Komplex.

Versuch 2: Ninhydrin-Reaktion

Materialien

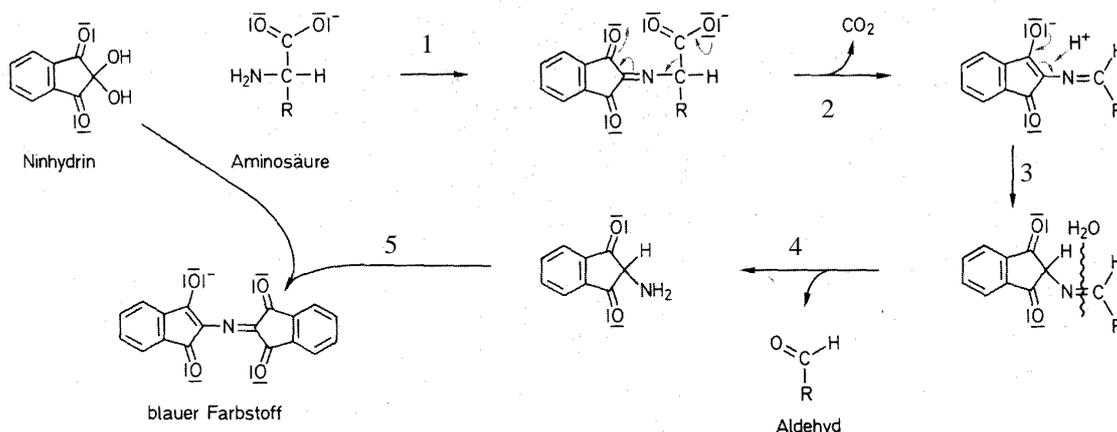
Ninhydrin (1 % ige Lösung in Ethanol), Eiklar, Reagenzglas im Ständer, Spatel, Gasbrenner mit Feuerzeug.

Durchführung

Etwas Eiklarlösung wird mit wenig Ninhydrin versehen und vorsichtig (!) erwärmt.

Erklärung

Ninhydrin reagiert mit Peptiden zu einem blauen **Indigo-Farbstoff**:



Aufgaben

- Ergänzen Sie bei den Reaktinsschritte 1 - 5 die abgespaltenen oder aufgenommenen Wassermoleküle
- Kennzeichnen Sie die Schritte 1 - 5 als Hydrolyse, Kondensation, Decarboxylierung oder Keto-Enol-Tautomerie.
- In Schritt 4 werden zunächst zwei Moleküle Wasser aufgenommen und anschließend wieder ein Molekül Wasser aus dem entstandenen **Diol** abgespalten, so dass der **Aldehyd** entsteht. Formulieren Sie diesen Zwischenschritt mit Strukturformeln.
- Zwei der übrigen Schritte 1, 2, 3 oder 5 sind Umkehrungen von Schritt 4. Welche beiden sind es?

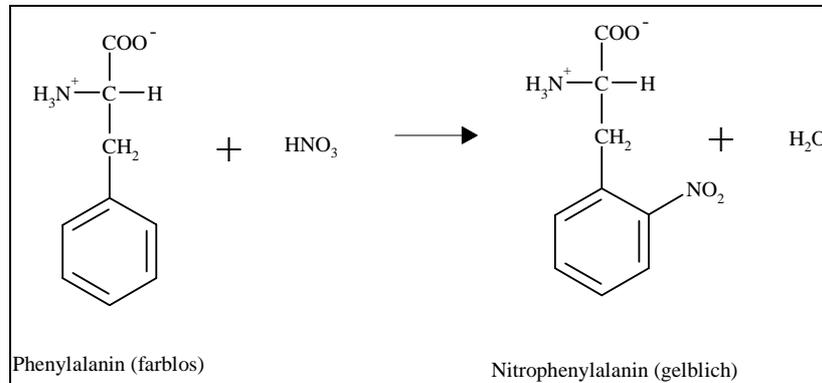
Versuch 3: Xanthoprotein-Reaktion

Durchführung

Eiweißlösung wird mit konz Salpetersäure HNO_3 (aq) versetzt.

Erklärung

Mit konz Salpetersäure färben sich Proteine gelblich. Die Färbung kommt durch der **Nitrierung der aromatischen Reste** von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zustande und zeigt eigentlich nicht die Peptidbindung, sondern **Aromaten** an:



Aufgabe

Erläutern Sie den Reaktionsmechanismus der Nitrierung von Aromaten. Wie heißt das angreifende elektrophile Teilchen und wie entsteht es?

Versuch 4: Chromatografie eines AS-Gemisches

Geräte:

Tüpfelplatte, Dünnschichtplatten (Kieselgel 60 auf Plastikfolie) mit passendem Becherglas mit passendem Uhrglas, 5 Glaskapillaren, 2 Pipetten., Fön, 20 ml-Messzylinder

Chemikalien:

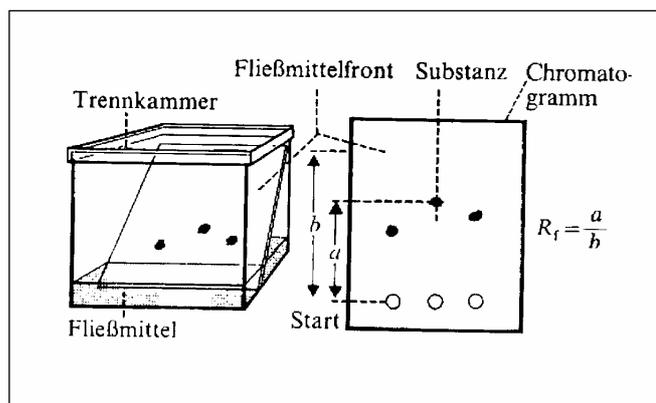
Vier Aminosäuren, z.B. L-Lysin, L-Alanin, L-Valin, L-Leucin, Butan-1-ol, Ethanol, konz. Ethansäure, Wasser, Ninhydrin-Sprühreagenz (0,3 g Ninhydrin in 100 ml Butan-1-ol und 3 ml Ethansäure gelöst),

Durchführung:

1. In insgesamt 5 Mulden der Tüpfelplatte werden jeweils wenige Kristalle der einzelnen AS (Nr. 1 - 4) bzw. ein Gemisch aller vier AS (Nr. 5) in jeweils 1 Tropfen Wasser und 1 Tropfen Ethanol gelöst.
2. In einem Messzylinder wird das **Laufmittel** aus 8 ml Butan-1-ol, 2 ml Ethansäure und 2 ml Wasser
3. Auf der DC-Platte wird in 1 cm Höhe mit dünnem Bleistiftstrich eine **Startlinie** aufgezeichnet. Die 5 **Lösungen** werden mittels einer **Kapillaren** nebeneinander auf die Startlinie aufgetragen.
4. Die DC-Platte wird in das Becherglas gestellt, das ca. 0,5 cm hoch mit Laufmittel gefüllt ist. Das Becherglas wird mit einem Uhrglas bedeckt.
5. Wenn das Laufmittel bis etwa 1 cm an den oberen Rand des Papierstreifens aufgestiegen ist, wird die DC-Platte aus dem Becherglas entfernt und die **Laufstrecke h** mit Bleistift markiert und aufgeschrieben.
6. Die DC-Platte wird kurz mit dem Fön getrocknet, mit Ninhydrin besprüht und dann bei 100 °C im Trockenschrank oder wieder mit dem Fön getrocknet
7. Die 5 Flecken werden mit dünnem Bleistiftstrich umrandet und ihre Farben und **Laufstrecken a** notiert.

Aufgaben:

- a) Bestimmen Sie die R_f -Werte (siehe Skizze) aller vier Aminosäuren.
- b) Die Adsorptionsschicht aus Kieselgel ist stärker polar als das Laufmittel. Ordnen Sie die vier Aminosäuren **anhand der R_f -Werte** nach steigender **Polarität** und begründen Sie.
- c) Ordnen Sie die vier Aminosäuren **anhand ihrer Strukturformeln** nach steigender **Polarität** und vergleichen Sie mit dem Ergebnis aus b).



Erklärung

Stellt man saugfähiges Papier (Cellulose) oder eine mit einer dünnen saugfähigen Schicht (Aluminiumoxid, Siliziumdioxid oder Cellulose) beschichtete Glasplatte einige Millimeter tief in ein Fließmittel (meist Mischungen aus Wasser, Säuren und verschiedenen organischen Lösungsmitteln), so wandert das Fließmittel aufgrund der **Kapillarwirkung** des Materials langsam nach oben. Befindet sich auf dem Papier oder der Schicht an einer Stelle nahe dem unteren Rand ein Stoffgemisch, z. B. mehrere Farbstoffe, so werden seine Komponenten im allgemeinen durch das Fließmittel unterschiedlich schnell mitgeführt, so daß sie - im Vergleich zur Fließmittelfront - verschieden schnell wandern. Es erfolgt eine **Auftrennung** des Stoffgemisches. Das Verfahren heißt **Chromatographie** (von griech. chroma, Farbe; graphein, schreiben), da es erstmals zur Trennung von Blattfarbstoffen angewandt wurde.

Bei der Papier- und der Dünnschichtchromatographie wird also eine **stark polare stationäre Phase (Papier, Dünnschichtplatte)** von einer **weniger polaren mobilen Phase (Fließmittel)** durchwandert. Dabei werden die einzelnen Komponenten eines Stoffgemisches, das auf der stationären Phase aufgebracht ist, je nach Polarität verschieden weit transportiert und damit getrennt. Je polarer eine Komponente ist, desto stärker **haftet** sie an der stationären Phase und desto langsamer wird sie transportiert. (**Adsorptionschromatographie**).

Adsorption ist aber nicht der einzige Rückhalteeffekt. Häufig befindet sich auf der Oberseite der stationären Phase ein Flüssigkeitsfilm, meist Wasser oder ein Gemisch aus Wasser und kondensierten Dämpfen des Fließmittels. Papier kann z. B. Wasser bis zu einem Massenanteil von 10 % enthalten. Daher konkurriert die Löslichkeit des wandernden Stoffes in diesem (polaren) Flüssigkeitsfilm mit der Löslichkeit im (weniger polaren) Fließmittel und sorgt durch die unterschiedliche **Verteilung** in den beiden Lösungsmitteln für einen weiteren Trenneffekt (**Verteilungschromatographie**).

