

Biochemie-Übungen

Stand: Mai 2012

Versuchsanleitungen:

1. Praktikumskomplex: Charakterisierung wichtiger Substanzklassen.....	2
1.1. Fette	2
1.2. Harnstoff.....	2
1.3. Aminosäuren	3
1.4. Nachweis des Kolloidcharakters von Proteinen.....	4
1.5. Nachweis von Bestandteilen der DNA.....	5
1.6. Kohlenhydrate	6
1.7. Nachweisreaktionen spezieller Lipide.....	9
2. Praktikumskomplex: Verdauung, Ernährung, Vitamine	11
2.1. Nachweis von Sorbinsäure	11
2.2. Nachweis der reduzierenden Wirkung der Ascorbinsäure (Vitamin C).....	12
2.3. Chemischer Nachweis des Vitamins A	13
2.4. Chemischer Nachweis auf Vitamin B2	13
3. Praktikumskomplex: Photometrische Bestimmungsmethoden	14
3.1. Quantitative Bestimmung des Gesamtchlorophylls in Pflanzenteilen	14
3.2. Bestimmung von Hämoglobin im Blut	14
3.3. Bestimmung der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) im Optischen Test	14
3.4. Bestimmung von Harnstoff im Harn	15
3.5. Bestimmung von Harnsäure im Harn	17
3.6. Quantitative DNA-Bestimmung nach DISCHE	17
3.7. Gesamtzuckerbestimmung im Pflanzenextrakt mit Anthron	18
3.8. Amino-N-Bestimmung mit Ninhydrin	19
3.9. Proteinbestimmung nach der BIURET-Methode.....	19
3.10. Anthocyanmetallkomplexe.....	19
4. Verfahren	24
4.1. Elektrophoretisches Trennverfahren	24
4.2. Kristallisation von Proteinen	27

1. Praktikumskomplex: Charakterisierung wichtiger Substanzklassen

1.1. Fette

■ Nachweis von Glycerin in Fetten

Erwärmen Sie in einem trockenen Reagenzglas 1 Tropfen Olivenöl mit 2 Spatelspitzen festem KHSO_4 (Abzug!). Der unangenehme Geruch nach Propenal (Acrolein) zeigt die Anwesenheit von Glycerin im Fett an. Ein in das Reagenzglas gehaltener mit ammoniakalischer Silbernitratlösung befeuchteter Papierstreifen färbt sich zunächst braun und dann schwarz. Formulieren Sie die Reaktionsgleichung!

■ Nachweis von Aldehyden in ranzigen Fetten

10 Tropfen ranziges Öl werden in 2 ml gesättigter NaCl -Lösung kurz erwärmt und anschließend mit einigen Tropfen fuchsinschwefliger Säure versetzt. Beobachtung und Erklärung:

■ Nachweis der $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung in ungesättigten Fettsäuren

Lösen Sie 2 - 3 Tropfen Olivenöl in 2 ml Chloroform und versetzen mit 1 ml Bromwasser unter Schütteln (Blindversuch, nur mit Chloroform durchführen). Notieren Sie Ihre Beobachtung!

■ Verseifung von Fetten

Versetzen Sie 1 Tropfen Olivenöl mit 3 ml Ethanol und einem Plätzchen KOH und erhitzen. Verdünnen Sie die Mischung mit dem doppelten Volumen dest. Wasser und säuern mit 1 M H_2SO_4 an. Der entstehende Niederschlag besteht aus Fettsäuren. Formulieren Sie die alkalische Hydrolyse des Fettes!

■ Glycerin, Hainesche Probe

3 ml destilliertes Wasser werden mit je 5 Tropfen 2 M CuSO_4 -Lösung und 2 M NaOH versetzt. Der entstandene voluminöse blaue Niederschlag löst sich nach Zugabe von 5 Tropfen Glycerol unter Farbvertiefung wieder auf. Warum?

1.2. Harnstoff

■ Nachweis von Harnstoff (Biuret-Reaktion)

Erhitzen Sie 3 Spatelspitzen Harnstoff im Reagenzglas vorsichtig mit kleiner Flamme. Die Masse schmilzt zunächst und es entsteht Ammoniak. Dann erstarrt die Schmelze. Versetzen Sie den abgekühlten festen Rückstand mit 3 ml dest. Wasser und erwärmen einige Minuten. Filtrieren Sie die heiße Lösung und versetzen das Filtrat mit einigen Tropfen 1 M NaOH und 5 Tropfen 0,1 M CuSO_4 -Lösung. Die Lösung wird violett. Die gleiche Reaktion geben auch Proteine. Warum? Formulieren Sie den Harnstoffnachweis!

■ Alkalische Hydrolyse des Harnstoffs

Geben Sie im Reagenzglas zu einer Spatelspitze Harnstoff 2 ml dest. Wasser sowie 2 Plätzchen NaOH und erwärmen. Weisen Sie in den entweichenden Dämpfen Ammoniak nach und formulieren Sie die Reaktionsgleichung!

1.3. Aminosäuren

■ Ninhydrin-Reaktion

Lösen Sie im Reagenzglas eine kleine Spatelspitze Glycin (Aminoessigsäure) in 3 ml dest. Wasser und geben 1 ml der ausstehenden Ninhydrinlösung (1,2,3-Indantrionhydrat) hinzu. Erhitzen Sie die Mischung zum Sieden und kühlen nach 1 min. ab.

Notieren Sie das Ergebnis der Ninhydrin-Reaktion!

Formulieren Sie die Reaktionsgleichung!

■ Glycin Kupfer

Lösen Sie eine Spatelspitze Glycin in 3 ml dest. Wasser, geben eine Spatelspitze CuCO_3 hinzu und kochen 1 min. auf. Nach dem Filtrieren der heißen tiefblauen Lösung kristallisiert "Glycinkupfer" als Chelatkomplex in feinen Nadeln aus. Formulieren Sie den Chelatkomplex!

■ Xanthoproteinreaktion zum Nachweis aromatischer Aminosäuren

Im Reagenzglas werden 2 ml Eiweißlösung (ca. 1%ig) mit 1 ml konz. HNO_3 versetzt (weiße Fällung) und 1 min. schwach erhitzt (Vorsicht!). Es tritt Gelbfärbung auf. Nach dem Abkühlen in Eiswasser wird vorsichtig mit 1 ml konz. NaOH (2 Plätzchen NaOH in 1 ml dest. Wasser) alkalisiert. Die Reaktion beruht auf der Nitrierung der aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan).

■ EHRLICH'S-Reaktion

2 ml Proteinlösung werden mit 2 ml konz. HCl erhitzt. Dann fügt man 2 Tropfen einer 5%igen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in 10%iger Schwefelsäure hinzu. Bei Vorhandensein von Indolverbindungen (Tryptophan) entsteht eine rotviolette Färbung. Man versetzt mit einigen Tropfen einer 5%igen Natriumnitritlösung. Der Farbton wird dadurch verstärkt.

■ Desaminierung von Aminosäuren (Reaktion nach VAN SLYKE)

Lösen Sie 1 Spatelspitze NaNO_2 in 2 - 3 ml 0,1 M Salzsäure und fügen 1 Spatelspitze Glycin hinzu. Es tritt eine Gasentwicklung (Stickstoff) ein.

Formulieren Sie den Reaktionsablauf!

■ Formolreaktion des Glycins (SÖRENSEN)

Versetzen Sie eine Spatelspitze Glycin in 3 ml dest. Wasser mit 1 Tropfen Phenolphthalein und geben 0,1 M NaOH bis zum Farbumschlag nach Rosa hinzu. Stellen Sie in einem anderen Reagenzglas 2 ml einer Formalinlösung mit Phenolphthalein und NaOH auf den gleichen pH-Wert (welcher?) ein (Formaldehyd enthält Verunreinigungen an Ameisensäure (woher?). Vereinigen Sie beide Lösungen und prüfen den pH-Wert mit Indikatorpapier!

Formulieren Sie den Reaktionsablauf.

■ Biuret-Reaktion bei Proteinen

Versetzen Sie 2 ml Eiweißlösung mit einigen Tropfen 0,1 M NaOH und 1 Tropfen 0,1 M CuSO_4 -Lösung. Die Lösung wird violett.

■ **Nachweis von Arginin (nach SAKAGUCHI)**

Verdünnen Sie im Reagenzglas einige Tropfen Eiweißlösung mit 3 ml dest. Wasser und versetzen Sie 2 - 3 Tropfen MOLISCH-Reagenz (Lösung von 50 mg 1-Naphthol und 5 g Harnstoff in 100 ml Ethanol). Nach dem Umschütteln fügt man 1 ml einer Lösung von 0,7 ml Brom und 5 g NaOH in 100 ml dest. Wasser (Abzug!) hinzu. Die auftretende Rotfärbung ist spezifisch für das Guanidinderivat Arginin.

■ **Diazo-Reaktion (nach PAULY)**

Vermischen Sie im Reagenzglas 3 ml einer 0,5%igen Lösung von Sulfanilsäure in 0,5 M HCl mit einigen Tropfen einer 0,5%igen wässrigen Lösung von NaNO_2 . Nach 1 min. geben Sie 1 ml dieses Reagenz' zu 2 ml Eiweißlösung (ggf. wässrige Lösung von Tyrosin) und schütteln um. Nach dem Alkalisieren mit einer wässrigen 10 %igen Na_2CO_3 -Lösung (o. NH_3 -Lösung) färbt sich das Protein rot (Nachweisreaktion für aromatische Aminosäuren wie Tyrosin und Histidin, die mit Diazoniumsalzen zu einem Azofarbstoff kuppeln können).

■ **Nachweis schwefelhaltiger Aminosäuren**

Versetzen Sie im Reagenzglas 2 ml Eiweißlösung mit 2 ml konz. NaOH (2 Plätzchen NaOH in 2 ml dest. Wasser gelöst) und kochen 2 min lang. Der Geruch des entweichenden Ammoniaks lässt den als Aminogruppe gebundenen Stickstoff im Eiweiß erkennen. Teilen Sie die Lösung auf 2 Reagenzgläser auf und versetzen die eine erkaltete Probe mit 1 Tropfen einer 1 %igen Natriumnitrosylprussiatlösung, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$. Die Rotfärbung zeigt die bei der Hydrolyse des Proteins entstandenen Sulfid-Ionen an. Zur anderen Probe geben Sie einige Tropfen einer 10%igen Bleiacetatlösung. Die eintretende Braun- bzw. Schwarzfärbung resultiert von ausgefallenem PbS. Unter den genannten Bedingungen werden die S-haltigen Aminosäuren Cystein bzw. Cystin erfasst, Methionin hingegen ist gegen die alkalische Hydrolyse beständig.

■ **Eisen-Cystein-Komplex**

Versetzen Sie in einem Reagenzglas etwas Cystein in 5 ml Wasser mit einigen Tropfen einer 0,1 M Fe (III) chlorid-Lösung.

1.4. **Nachweis des Kolloidcharakters von Proteinen**

■ **Kochprobe**

Die mit wenig 2 M Essigsäure oder Essigsäure-Acetat-Puffer (pH 4,7) angesäuerte Eiweiß-Probe (etwa 2ml) wird etwa 30 sec. gekocht. Das Protein fällt als Niederschlag aus. Spuren von Protein lassen sich noch durch ein „Opaleszieren“ der Probe nachweisen.

■ **Säurefällungen**

3 - 4 ml Eiweißlösung wird mit 1ml Eisessig und etwas Kochsalz versetzt. Das Protein flockt aus. Die Fällung wird durch tropfenweise Zugabe einer 10%igen Lösung von gelbem Blutlaugensalz noch gesteigert.

■ **Sulfosalicylsäureprobe**

Zu 1 ml Proteinlösung werden einige Tropfen Sulfosalicylsäurelösung (10 g / 100 ml) gegeben. Im sauren pH-Bereich tritt Niederschlagsbildung auf.

■ Hellersche Probe

Konzentrierte Salpetersäure wird vorsichtig mit Proteinlösung überschichtet. Präzipitation der Proteine durch Wasserentzug und Nitrierung führt zu einem weißen Niederschlag, der sich ringförmig an der Berührungsstelle der zwei Phasen ausbildet.

■ Schwermetallionenzusatz

Erwärmen Sie im Reagenzglas 1 ml Eiweißlösung mit einigen Tropfen einer 10%igen Bleiacetat-Lösung. Es tritt eine irreversible Fällung des Proteins ein.

1.5. Nachweis von Bestandteilen der DNA

■ Löslichkeit von Nucleinsäuren

1 ml Nucleinatlösung (Anmerkung: in welchem Protonierungszustand liegt DNA im Neutralen vor?) wird mit 1 -2 Tropfen 2 M Salzsäure versetzt. Was geschieht stattdessen bei Zugabe von 2 M Natronlauge?

■ Verhalten von Nucleinsäuren gegenüber Proteinen

1 ml Nucleinatlösung wird mit 0,2 M Essigsäure bis zum Auftreten einer leichten Trübung angesäuert (ca. 10 ml) und mit 1 ml einer verdünnten Eiweißlösung versetzt.

■ Nachweis von Desoxyribose

Versetzen Sie im Reagenzglas 1 ml einer 0,5%igen DNA-Lösung mit 2 ml DISCHES Reagenz (1 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig lösen, mit 3 ml konz. H_2SO_4 versetzen), schütteln um und stellen die Probe 10 min im siedenden Wasserbad ab. Notieren Sie die Farbreaktion!

■ Purin

Mischen Sie im Reagenzglas 1 - 2 ml DNA-Lösung mit dem halben Volumen konz. H_2SO_4 (Vorsicht!) und erhitzen unter mehrmaligem Umschütteln 30 min lang im siedenden Wasserbad.

Verdünnen Sie dann mit dem doppelten Volumen dest. Wasser und lassen erkalten. 1 - 2 ml des Hydrolysats entnehmen Sie mit der Pasteur-Pipette, alkalisieren mit konz. NH_3 und versetzen mit einigen Tropfen ammoniakalischer $AgNO_3$ -Lösung.

Es entsteht ein gallertartiger weißer Niederschlag, der vorwiegend aus Silbersalzen des Adenins und Guanins besteht.

■ Murexidprobe

Versetzen Sie in einer Porzellanschale 1 Mini-Spatelspitze fester Harnsäure mit 4 - 5 Tropfen 2 M HNO_3 und dampfen unter dem Abzug (Sparflamme) bis zur Trockene ein. Lassen Sie nach dem Erkalten von der einen Seite 1 Tropfen 2 M NH_3 -Lösung und an anderer Stelle einen Tropfen 2 M NaOH einfließen. Notieren Sie Ihre Beobachtung!

■ Purinnachweis als Purpursäure

Durch Oxidationsmittel wie HNO_3 oder H_2O_2 werden Purine in Purpursäure umgewandelt. Nach Zugabe von Ammoniak entsteht Murexid, das farbige Ammoniumsalz der Purpursäure. Erklären Sie!

1.6. Kohlenhydrate

■ Reaktion der Aldosen und Ketosen mit Fehlingscher Lösung

Aus einer alkalischen Kupfersalz-Lösung, in der die Kupferionen durch Zugabe von Weinsäure komplex in Lösung gehalten werden (Fehlingsche Lösung), fällen reduzierende Verbindungen in der Wärme orangerotes Kupfer(I)-oxidhydrat. Das Reagenz ist besonders zum Nachweis reduzierender Zucker geeignet. Andere reduzierende Verbindungen (aliphatische Aldehyde, Polyphenole) reagieren ebenfalls positiv, aromatische Aldehyde dagegen normalerweise nicht.

Erklären Sie, warum sowohl die Aldose als auch die Ketose reduzierend wirken!

Vorschrift:

1. Darstellung der Fehlingschen Lösung:

Fehling I: 2 ml einer 0,1 M CuSO_4 -Lösung werden in einem Reagenzglas mit 2 ml 1 M Seignette-Salzlösung versetzt.

Fehling II: In ein Reagenzglas werden 2 ml 1 M Natronlauge gegeben.

2. Durchführung der Fehlingschen Probe:

Geben Sie in 2 Reagenzgläser je 2 ml Fehling-Lösung (1 ml Fehling I + 1 ml Fehling II) und fügen zur ersten Probe 1 ml konz. wässrige Glucoselösung (2 Spatelspitzen/ml), zur zweiten Probe 1 ml konz. wässrige Fructoselösung hinzu. Stellen Sie beide Reagenzgläser in ein siedendes Wasserbad und beobachten den Reaktionsverlauf.

■ BENEDICT-Probe 1

In einem Reagenzglas werden 1,5 ml BENEDICT -Reagenz (CuSO_4 , Natriumcitrat und Natriumcarbonat in Wasser gelöst) mit 3 Tropfen 2 %iger Glucose-Lösung 2 Minuten in einem siedenden Wasserbad erhitzt ...

■ BENEDICT -Probe 2

Wiederholen Sie BENEDICT - und FEHLING-Probe unter gleichen Bedingungen mit verdünnten Lösungen (kleine Spatelspitze Substanz in 2 ml Wasser) von Lactose, Saccharose und Amylose (verwenden Sie dafür Stärke. Worin besteht der Unterschied zwischen Stärke und Amylose?).

■ BENEDICT -Probe 3

Kochen Sie in Reagenzgläsern jeweils eine Spatelspitze Rohrzucker oder Stärke in 1 ml 1 M Salzsäure ca. 1 min, neutralisieren Sie mit Natronlauge und prüfen Sie mit FEHLING - und BENEDICT -Reagenz.

Was meinen Sie zur sauren Hydrolyse?

■ Probe auf reduzierende Zucker und andere stark reduzierende Verbindungen mit TOLLENS-Reagenz

Zahlreiche reduzierend wirkende Verbindungen reduzieren Silbersalze in alkalischer Lösung zum Metall. Hält man die Silberionen dabei durch Zugabe von Ammoniak in Lösung (= TOLLENS-Reagenz), so lässt sich das Silber als glänzender Spiegel an der Glasoberfläche abscheiden. Besonders gute Silberspiegel erhält man, wenn man das Glas zunächst mit konz. Salpetersäure auskocht, mit Wasser wäscht, mit 5 % Zinn(II)-chlorid-Lösung in konz. Salzsäure und anschließend sorgfältig mit viel destilliertem Wasser spült. Der Vorgang erzeugt einen Film von Zinn(II)-hydroxid, das die Kristallisation fördert.

Vorschrift zum Ansetzen des TOLLENS-Reagenz!

Reagenz immer frisch bereiten, alte Lösungen neigen zu Explosionen! Zu 2 ml einer 5 % Silbernitrat-Lösung fügt man Ammoniak, bis sich der zunächst gebildete Niederschlag aufgelöst

hat. Danach gibt man 5 Tropfen 5 M Natronlauge zu und dann verdünnte Ammoniak-Lösung, bis sich der gebildete Niederschlag gerade wieder gelöst hat; ein Überschuss ist zu vermeiden. Zu 2 ml der Reagenzlösung gibt man 1 ml wässrige Glucose-Lösung (kleine Spatelspitze in 1 ml Wasser) und lässt bei Raumtemperatur stehen oder erwärmt schwach im Wasserbad. Die Bildung eines Silberspiegels zeigt reduzierende Verbindungen (Zucker, aber auch andere Verbindungen!) an.

Nicht-reduzierende Zucker (Versuch mit Saccharose durchführen) werden durch kurzes Erhitzen mit 2 M H_2SO_4 gespalten und reagieren dann ebenfalls positiv. Reduzierend wirken weiterhin Acyloine, α -Diketone, aliphatische und aromatische Aldehyde, mehrwertige Phenole, 1-Naphthole, Aminophenole, Hydrazine, Hydroxylamine, einige aromatische Amine (Diphenylamin).

■ Barfoeds Reagenz

Während Fehlingsche Lösung auch von reduzierenden Disacchariden wie Lactose und Maltose reduziert wird, erhält man in essigsaurer Kupferacetat-Lösung nur mit reduzierenden Monosacchariden einen Niederschlag.

Vorschrift:

0,1 g D-Glucose werden mit 50 mg Kupferacetat und 1 ml 0,2 % Essigsäure im siedenden Wasserbad erwärmt. Reduzierende Monosaccharide ergeben innerhalb von 2 Minuten einen gelben oder roten Niederschlag. Reduzierende Disaccharide reagieren allenfalls bei erheblich längerem Erhitzen positiv (Versuch mit Lactose oder Maltose).

■ Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure

Vergleichen Sie die Reaktionen: a) 2 %ige Glucoselösung mit 2 -3 Tropfen fuchsinschwefeliger Säure b) Formalin mit 2 -3 Tropfen fuchsinschwefeliger Säure. Erklärung?

■ Molisch-Test auf Kohlenhydrate

Beim Behandeln mit starken Säuren werden Oligo- und Polysaccharide hydrolytisch gespalten. Die entstandenen Monosaccharide gehen unter den Versuchsbedingungen zum Teil in Furfural oder Hydroxymethylfurfural über, das durch Kondensation mit 1- oder 2-Naphthol oder Bildung Schiffscher Basen empfindlich nachgewiesen werden kann. Da der Nachweis nicht auf einer Reduktion beruht, reagieren auch nichtreduzierende Zucker positiv, nicht jedoch die gegen Fehlings- und Tollens-Reagenz positiven Phenole.

Eine Lösung von 0,1 g der Analysensubstanz in 2 ml Wasser und 5 Tropfen einer 5 % alkoholischen 1-Naphthol-Lösung und 10 ml konz. Salzsäure wird erhitzt: Saccharose und Fructose ergeben sofort eine Violettfärbung, Glucose, Maltose und Lactose dagegen erst nach etwa 1 Minute. Als Analysensubstanz verwenden Sie Saccharose und Glucose!

■ Seliwanoff-Probe

Versetzen Sie 1 - 2 ml einer verdünnten Fructoselösung (kleine Spatelspitze in 2 ml Wasser) mit dem gleichen Volumen einer Lösung von Resorcin (0,5%ige Lösung in 20%iger Salzsäure) und erhitzen bis zum Sieden. Die auftretende Rotfärbung ist für Ketohexosen spezifisch.

■ Osazonbildung

In einem Reagenzglas löst man 0,2 g Zucker, 0,4 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 0,6 g Natriumacetat in 4 ml Wasser. Man erwärmt den Ansatz im siedenden Wasserbad (max. 30 min) und notiert die Zeit, nach der sich die ersten Kristalle abscheiden. Eine Probe der Kristallsuspension wird unter dem Mikroskop betrachtet. Abbildungen zu den Kristallformen

liegen aus. Welchen Zucker haben Sie demnach identifiziert? **Geben Sie das Ergebnis der Analyse Ihrer Probe beim Assistenten an.**

Zeit bis zur Abscheidung des Osazons			
Mannose:	0,5 - 1 min	Rhamnose:	13 - 15 min
Fructose:	2 - 2,5 min	Galactose:	14 - 16 min
Glucose:	4 - 5 min	Arabinose:	15 - 17 min
Ribose:	6 - 7 min	Saccharose:	25 min
Xylose:	8 - 10 min	Glucosamin:	30 min
Sorbose:	14 min	Raffinose:	60 min

Die Osazone von Lactose, Cellobiose und Maltose lösen sich in der Hitze und kristallisieren erst beim Erkalten aus.

■ Unterscheidung von Ketohexosen und Aldohehexosen

Schwefel- oder salzsaure Lösungen von Harnstoff und Zinn(II)-chlorid ergeben beim Erwärmen mit Ketohehexosen eine Rotfärbung, während die Lösungen von Aldohehexosen erst bei längerem Erhitzen orange werden. Saccharose wird zu Glucose und Fructose hydrolysiert und reagiert ebenfalls positiv.

Versuch:

Eine Probe des Zuckers wird mit 200 mg Harnstoff und einem Kristall Zinn(II)-chlorid in 2 ml konz. Salzsäure über dem Brenner vorsichtig erhitzt. In Gegenwart von Ketohehexosen wird die Lösung schnell kirschrot, während Aldohehexosen erst nach längerem Erwärmen Orange-färbungen ergeben. Versuche mit Glucose, Fructose und Saccharose durchführen!!

■ Nachweis von Zuckern mit Triphenyltetrazoliumchlorid

Die Reduktion des farblosen Triphenyltetrazoliumchlorids zu rotem Triphenylformazan in heißer alkalischer Lösung außerordentlich empfindlich und zeigt bereits 5 µg eines reduzierenden Zuckers an.

Versuch:

Einige Tropfen 0,5 M NaOH und 0,5 % Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung in Wasser werden mit der Analysenprobe 1 - 2 min zum Sieden erhitzt. Eine Rotfärbung oder ein roter Niederschlag zeigen reduzierende Zucker oder andere Reduktionsmittel an. Wählen Sie selbst eine Analysensubstanz. Analysensubstanz: Glucose, Fructose oder Saccharose.

■ Qualitativer Nachweis der Polysaccharide (Iodreaktion)

Zu je 4 ml 1 %iger Lösungen von

- Stärke (1 g Kartoffelstärke verrührt man in der Kälte mit 2 ml Wasser. Der Brei wird anschließend mit 20 ml kochendem dest. Wasser übergossen. Nach Filtration erhält man eine klare Lösung von Stärke).
- Glykogen
- Pektin
- Inulin

werden in der Kälte 4 Tropfen "Iodiodkalium" (Lugolsche Lösung: 0,5 g Iod + 1 g KI in 100 ml dest. Wasser; braune Flasche!) gegeben. Es wird ein Blindwert mit dest. Wasser zum Vergleich angesetzt. Iod ergibt mit spiralförmig aufgebauten (helicalen) Polysacchariden bestimmte Farbreaktionen (sogenannte Einschlussverbindungen), die vom Verzweigungsgrad und dem Molekulargewicht der Polysaccharide abhängen. Mit Stärke (auch Amylose) tritt

eine Blaufärbung ein, die bei Erwärmung verschwindet und bei Abkühlung wieder auftritt. Glykogen ergibt eine rötliche Farbe. Das nicht verzweigte Inulin reagiert nicht.

■ Verfolgen der Stärkehydrolyse durch Speichelamylase

Prinzip

Die enzymatische Stärkespaltung lässt sich entweder anhand der Abnahme des Substrates (Abschwächung oder Negativwerden der Iodprobe) oder der Bildung niedermolekularer Spaltprodukte (Nachweis reduzierender Zucker mittels der Reduktionsprobe) verfolgen.

Reagenzien

- Stärkelösung 0,5%ig
- Iodlösung (1%ig für I₂, 2%ig KI in dest. Wasser)
- Phosphatpuffer pH 7,2 mit und ohne Zusatz von 0,3% NaCl
- Verdünnte Salzsäure 2 M

Durchführung

Als Enzym dient verdünnter Mundspeichel. Dieser wird am einfachsten gewonnen, indem man die Mundhöhle während 1 - 2 min mit ca. 10 ml Wasser spült. Nach Filtration kann die Probe dreifach mit dest. Wasser verdünnt werden. Eine Reihe von 6 parallelen Ansätzen wird gemäß den in der Tabelle gegebenen Anweisungen vorbereitet.

Proben-Nr.						
	1	2	3	4	5	6
Zusätze in ml (approximativ)						
Amylase (Speichellösung)	-	2 ml	2 ml	-	2 ml	2 ml
s. o. hitzeinaktiviert	-	-	-	2 ml	-	-
Stärkelösung	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	-	3 ml
Puffer-NaCl-Lösung, pH 7,2	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
Salzsäure 2M (3 - 4 Tropfen)	-	-	+	-	-	-
dest. Wasser	2 ml	-	-	-	3 ml	-
Pufferlösung ohne NaCl	-	-	-	-	-	1 ml

Die Proben werden je nach zugesetzter Enzymmenge während 10 bis 30 min bei 37°C inkubiert und dann mit je drei Tropfen Iodlösung versetzt. Die Beurteilung der Ansätze erfolgt nach kräftigem Mischen aufgrund der resultierenden Färbungen. Dabei dienen die Proben 1 (kein Stärkeabbau) und 5 (keine Stärke vorhanden) als negative Kontrollen.

1.7. Nachweisreaktionen spezieller Lipide

■ Isolierung von Lecithin und Cholesterol aus Eigelb

Vorsicht beim Arbeiten mit Ether!

Durchführung und Auswertung

Gruppen mit ungerader Nummer präparieren Lecithin:

Das Eigelb eines hart gekochten Hühnereis wird fein zerkleinert und mit 50 ml 96 %igem Ethanol und 25 ml Ether (Vorsicht!) für 10 min bei Raumtemperatur unter Umrühren extrahiert. Es wird durch ein alkoholflechtes Papierfilter filtriert und der Rückstand nochmals mit

20 ml Ethanol-Ether (1 : 1) versetzt und filtriert. Die vereinigten Filtrate werden vorsichtig bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird mit 10 ml Ether versetzt und langsam in 30 ml Aceton gegeben. Dabei fällt Lecithin aus, das abfiltriert werden kann. Im Filtrat ist Cholesterol gelöst.

Gruppen mit gerader Nummer übernehmen das Filtrat von der vorigen Gruppe und präparieren Cholesterol:

Diese Ether-Aceton-Phase wird vorsichtig bis zur Trockne eingedampft (Abzug!). Nach Abkühlung löst man den geruchlosen Rückstand in 15 ml 10%iger alkoholischer KOH und bewahrt die Lösung 30 min in einem heißen Wasserbad auf. Man versetzt die abgekühlte Lösung (!) mit 30 ml Ether und filtriert. Das Cholesterol-enthaltende Filtrat wird auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingeengt. Cholesterol kann danach mit warmen Ethanol gereinigt und anschließend getrocknet werden. Mit dem gewonnenen Lecithinpräparat sind die unter "Phosphatide" aufgeführten qualitativen Nachweise durchzuführen.

Mit dem gewonnenen Cholesterolpräparat werden folgende Farbreaktionen zum Nachweis durchgeführt:

■ Reaktion nach Salkowski

Wenige Cholesterolkristalle werden in Chloroform gelöst. Die Lösung überschichtet man in einem Reagenzglas mit konz. H_2SO_4 . Die Chloroformphase färbt sich rot, die H_2SO_4 fluoresziert grünlich.

■ Reaktion nach Zak

Einige Cholesterolkristalle löst man in 3 ml Chloroform (auch 3 ml der im Versuch anfallenden Ether-Aceton-Phase sind einsetzbar). Sie werden über 2 ml konz. H_2SO_4 mit einigen Tropfen 10%ige $FeCl_3$ -Lösung in Eisessig geschichtet. An der Phasengrenze bildet sich ein braun-violetter Ring.

■ Reaktion nach Liebermann-Burchard

Einige Cholesterolkristalle werden in einem trockenen Reagenzglas in 3 ml wasserfreiem Chloroform gelöst und anschließend mit 2 Tropfen konz. H_2SO_4 und 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Beim vorsichtigen Mischen tritt eine intensive dunkelgrüne bis tiefblaue Färbung auf. Die Reaktion wird durch kleinste Mengen von Wasser gestört! Die Farbreaktion hält im Dunkeln etwa 20 min an.

Die Methode kann zur quantitativen colorimetrischen Cholesterolbestimmung genutzt werden (z. B. Bestimmung des Cholesterolspiegels im Blut). Für die aufgeführten Farbreaktionen sollen Bisteroide und Cholesterolether verantwortlich sein.

■ Reaktion nach WINDAUS (Anlagerung von Brom)

Eine Spatelspitze Cholesterol wird in einem trockenen Reagenzglas in 0,5 ml Ether gelöst. Bis zur bleibenden braun-orange Färbung (Bromfarbe) wird tropfenweise eine 5 %ige Brom-Eisessigmischung gegeben. Nach einer gewissen Zeit scheiden sich Kristalle von Cholesteroldibromid ab. Später erstarrt der Reaktionsansatz zu einer festen Masse. Die gewonnene Menge Cholesterol kann quantitativ bestimmt werden.

■ Phosphatide

■ Löslichkeit

Eine Probe Lecithin (Sojaphosphatid) wird in etwa 2 ml Ether gelöst und mit 5 ml Aceton versetzt. Das Verhalten gegen Aceton mit einer ebenso behandelten Probe Rizinusöl wird verglichen. Phosphatide sind in Aceton unlöslich.

■ Fällbarkeit

Eine Probe Lecithin (Sojaphosphatid) wird in etwa 5 ml Ethanol gelöst und mit halbgesättigter ethanolischer Cadmiumchloridlösung versetzt. Man vergleiche mit einer Probe Rizinusöl das Verhalten der Phosphatide, die mit der N-Gruppe eine unlösliche Komplexverbindung mit Cadmium eingehen.

■ Nachweis der Phosphorsäure:

Etwas Lecithin (Sojaphosphatid) wird in 5 ml 1 %iger Sodalösung aufgekocht (Verseifung). Nach Abkühlung werden die freigesetzten Fettsäuren durch tropfenweise Zugabe von 2M HNO_3 gefällt und durch Filtration über Glaswolle abgetrennt. Zum Filtrat gibt man festes Ammoniummolybdat. Beim Erhitzen fällt gelbes Phosphomolybdat aus.

■ Nachweis von Cholin:

Eine geringe Menge Lecithin wird in einem Reagenzglas mit 2 ml 40 %iger NaOH aufgekocht. Die entweichenden Dämpfe bestehen aus Trimethylamin. Sie färben ein angefeuchtetes rotes Lackmuspapier blau. Der auftretende "Fischgeruch" ist typisch für Trimethylamin.
Reaktionsablauf!

1 ml verdünnte Cholinlösung (3 %iges wässriges Cholinchlorid) wird mit 1 ml gesättigter wässriger Reinecke-Salzlösung ($[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{CNS})_4]\text{NH}_4$) versetzt. Nach kurzer Zeit fällt ein glitzernder Niederschlag aus. Er wird abfiltriert und in Aceton gelöst. Es entsteht eine dunkelrote Färbung.

■ Dünnschichtchromatographische Trennung eines Pflanzenextraktes

Bringen Sie ein frisches, möglichst dunkelgrünes Blatt mit (z. B. Spinat). Das Blatt wird zerkleinert und in ein Reagenzglas gegeben, mit Methanol/Aceton (1 : 2) übergossen und im Wasserbad erwärmt, bis das Lösungsmittel intensiv grün ist. Als Chromatographiematerial benutzen Sie einen Streifen Aluminiumfolie, die mit Kieselgel beschichtet ist (1 cm x 15 cm). Mit einer Kapillare tupfen Sie etwa 2 cm über dem Ende des Streifens 2 Tropfen der grünen Lösung auf und markieren mit dem Bleistift die Startlinie (Mittelpunkt des Substanzflecks). Geben Sie ca. 2 ml Toluol/Ethanol (5 : 1)-Lösung in ein trockenes Reagenzglas und stecken den präparierten DC-Streifen so in die Lösung, dass deren Oberfläche knapp unter dem grünen Fleck endet. Nach einer Laufzeit von ca. 20 min ist die Laufmittelfront etwa 10 cm gelaufen. Nehmen Sie den Streifen heraus und trocknen ihn. Man findet grüne (Chlorophyll- und Zersetzungsprodukte) und gelbe (Carotine) Flecken. Bestimmen Sie deren RF-Werte!

2. Praktikumskomplex: Verdauung, Ernährung, Vitamine

2.1. Nachweis von Sorbinsäure

Reagenzien:

- Lebensmittelprobe (Fleischsalat, Mayonnaise oder dergl.)
- Sorbinsäure
- Kaliumdichromatlösung 0,05 %ig (T+)
- Thiobarbitursäurelösung 0,5 %ig
- Schwefelsäure 0,3 N

Durchführung:

Führen Sie den Versuch einmal mit einer Spatelspitze Sorbinsäure und ein zweites mal mit einigen g einer Lebensmittelprobe durch. Die Probe wird in 2 ml dest. Wasser suspendiert, ca. 1 ml Schwefelsäure und 1 ml Kaliumdichromatlösung werden zugefügt und im siedenden Wasserbad für ca. 2 min erhitzt. Dann werden ca. 2 ml Thiobarbitursäurelösung zugegeben und das Reagenzglas für weitere 10 min ins siedende Wasserbad gestellt. Eine Rotfärbung zeigt Sorbinsäure an.

2.2. Nachweis der reduzierenden Wirkung der Ascorbinsäure (Vitamin C)

■ Reduktion von Cu(II) zu Cu(I)

Reagenzien:

- Ascorbinsäure
- Glycerol
- Soda
- Kupfersulfatlösung 1 M

Einige Milligramm Ascorbinsäure werden in ca. 3 ml dest. Wasser gelöst. Mit dieser Lösung und einem Parallelansatz mit Wasser wird die Reduktionsprobe nach COLE bei Zimmertemperatur ausgeführt. 3 ml der zu untersuchenden Lösung werden mit einer Spatelspitze wasserfreier Soda, 2 Tropfen Glycerol und 2 Tropfen Kupfersulfatlösung gemischt. Das große Reduktionsvermögen der Ascorbinsäure hat zur Folge, dass hier im Gegensatz zur Glukose eine Ausfällung von Kupfer(I)-oxid augenblicklich, d. h. ohne Erhitzen eintritt.

■ Reduktion von Dichlorphenolindophenol zur Leukoform

Reagenzien:

- Dichlorphenolindophenollösung (0,1 %)
- Methylenblaulösung (0,01 %)
- Natriumbicarbonat
- Essigsäure (Eisessig)
- Ascorbinsäurelösung (10 %)

2 ml Dichlorphenolindophenol-Indikatorlösung werden in zwei gleiche Portionen unterteilt. Zur einen gibt man einige Tropfen Essigsäure zur anderen eine Spatelspitze Bicarbonat. Tropfenweiser Zusatz einer frisch hergestellten Ascorbinsäurelösung bewirkt in beiden Fällen eine Entfärbung infolge Reduktion des Farbstoffes zur Leukoform. Auf analoge Weise lassen sich auch andere Farbstoffe entfärben. Versuch wiederholen mit 2 ml Methylenblau-Indikatorlösung!

Erklärung:

Das ausgeprägte Reduktionsvermögen der Ascorbinsäure hat zur Folge, dass in deren Gegenwart praktisch alle Redoxsubstanzen in die reduzierte Stufe überführt werden, und zwar bereits bei Zimmertemperatur und unabhängig vom pH-Wert. Dabei geht die Ascorbinsäure in die (biologisch inaktive) Dehydroascorbinsäure über. Die reaktionsfähige Dienolkonfiguration wird zur Diketostruktur.

2.3. Chemischer Nachweis des Vitamins A

■ Antimonchlorid-Test auf Vitamin A (Reaktion nach CARR-PRICE)

In 4 trockene Reagenzgläser gibt man je 2 ml Chloroform und löst darin

- a. eine kleine Spatelspitze Butter
- b. eine kleine Spatelspitze Margarine
- c. einen Tropfen Vitamin A-Lösung (Vitadral)
- d. Blindprobe, Leerwert

Alle Ansätze werden mit einem Tropfen Essigsäureanhydrid und anschließend mit einigen Kristallen Antimon(III)-chlorid versetzt. Je nach Vitamin A-Gehalt der Probe tritt eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung ein, die nach wenigen Minuten verblasst.

2.4. Chemischer Nachweis auf Vitamin B2

Vitamin B₂ - Riboflavin

Das Riboflavin wird in der Darmwand phosphoryliert und in Leber, Herz und Niere gespeichert. Das Riboflavin kommt erst als Coenzym zur Wirkung. Die Flavoproteine spielen bei der Wasserstoffübertragung im intermediären Stoffwechsel eine Rolle. Im gelben "Atmungsferment" bildet das Riboflavin die prosthetische Gruppe. Das Vitamin B₂ scheint, da es in großen Mengen in Linse, Netzhaut und Sehpurpur vorhanden ist, beim Sehvorgang eine Rolle zu spielen. Außerdem wirkt es beim Wasser- und Salzhaushalt mit. Das Riboflavin kommt in der Natur entweder frei oder an Protein gebunden als Coenzym vor. Das Riboflavin ist ein Derivat des Isoalloxazins. Wässrige Lösungen von Riboflavin fluoreszieren gelbgrün.

Vitamin B₂ und sein Leukoderivat bilden ein reversibles Redoxsystem. Dieses Phänomen wird auch bei der quantitativen Erfassung des Vitamins benutzt.

■ Nachweis des Redoxsystems:

Material und Methode: Riboflavin, Natriumdithionit.

Arbeitsgang: Man löst eine Spatelspitze Riboflavin in 100 ml Wasser. Die Lösung muss nicht von jeder Gruppe neu hergestellt werden. Man beobachtet die Fluoreszenz im durchscheinenden Licht. Zu 3 ml der Riboflavinlösung gebe man 2 Spatelspitzen Natriumdithionit hinzu. Die Lösung wird farblos. Messen Sie ein Spektrum von 250 – 700 nm. Man schüttelt einige Minuten und stellt fest, dass die Fluoreszenz wieder auftritt. Na₂S₂O₄ reduziert das Riboflavin; durch Luftsauerstoff erfolgt eine Reoxidation.

■ Riboflavinnachweis in Milch

Reagenzien:

- Milch
- Eisessig

Versetzen Sie 10 ml Milch mit 10 Tropfen Eisessig und lassen Sie kurz aufkochen und abkühlen bis zum klar abgesetzten Niederschlag. Es wird abfiltriert und kurz erhitzt. Anschließend wird das Filtrat auf Gelbgrünfluoreszenz im UV-Licht untersucht.

3. Praktikumskomplex: Photometrische Bestimmungsmethoden

3.1. Quantitative Bestimmung des Gesamtchlorophylls in Pflanzenteilen

Durchführung:

Besorgen Sie ein kräftig grünes Blatt. 100 - 200 mg Blattmasse (Einwaage genau bestimmen!) zurechtschneiden und die Blattfläche berechnen. Nach dem Zerkleinern des Blatt-Stückes dieses mit einer Spatelspitze CaCO_3 , etwas Quarzsand und einigen ml 80 % Aceton gut zerreiben, quantitativ in ein Zentrifugenröhrchen übertragen und zentrifugieren. Den Überstand in einen 25 ml Messkolben überführen und mit 80 % Aceton bis zur Marke auffüllen. In Küvetten von 1 cm Schichtdicke die Extinktion dieser Lösung bei 652 nm gegen das Extraktionsmittel (Aceton) messen.

Aufgabe: Berechnen Sie den Chlorophyllgehalt!

a) bezogen auf die Blattfläche in mg Gesamtchlorophyll/cm²

b) bezogen auf das Frischgewicht in mg Gesamtchlorophyll/g FG

Die Berechnung erfolgt nach der Formel: Gesamtchlorophyll (mg/1000 ml) = $30,0 \times E_{652}$

3.2. Bestimmung von Hämoglobin im Blut

Reagenzien:

Transformationslösung: 0,1 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 300 ml Wasser lösen; 0,1 g Kaliumcyanid zugeben, lösen und mit Wasser auf 500 ml auffüllen (Vorsicht Gift!). (Bei kühler und dunkler Lagerung ist diese Lösung ca. 3 Tage haltbar.)

Umgang beim Arbeiten mit Blut:

1. Es ist größte Vorsicht geboten!
2. Das Tragen von Handschuhen beim Arbeiten mit Blut ist Pflicht!
3. Das Blut nur mit einer Mikroliterpipette pipettieren und nicht mit dem Mund ansaugen!
4. Sauberes Arbeiten ist geboten!

Durchführung:

In ein Zentrifugenröhrchen mit Deckel 4 ml der ausstehenden Transformationslösung pipettieren (Vorsicht Gift!). Mit Hilfe einer Mikroliterpipette 38 μl Blut entnehmen und schnell in die Transformationslösung überführen; die Pipette nachspülen! Nach 25 - 30 min die Extinktion bei 540 nm in einer 1 cm-Küvette gegen Wasser messen.

Berechnung: $E_{540 \text{ nm}} \times 16 = \text{g Hämoglobin} / 100 \text{ ml Blut}$

Aufgabe: Berechnen Sie den Hämoglobingehalt in g/100 ml.

3.3. Bestimmung der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) im Optischen Test

Reagenzien (stehen fertig angesetzt aus):

- 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 9,0:
12 g Trishydroxymethylaminomethan in 500 ml Wasser lösen, dann mit 1 M HCl den pH von 9,0 einstellen und mit Wasser auf 1 l auffüllen.

- NAD⁺-Lösung: 120 mg Nikotinamid-adenin-dinucleotid in 1 ml Tris-HCl-Puffer, pH 9,0 lösen.
- ADH-Lösung: frisch präparierter Enzymextrakt wird zur Verfügung gestellt

Durchführung:

In 6 Reagenzgläser werden folgende Lösungen (in ml) pipettiert:

Reagenzglas-Nr.						
Substanz	1	2	3	4	5	6
Tris-Puffer	5	5	5	5	5	5
NAD ⁺	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Alkohole	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
	Ethanol	n-Propanol	n-Butanol	sec. Butanol	Isoamylalkohol	-

Die Ansätze gut mischen (z.B. vortexen) und die Extinktion der Proben 1 - 5 bei 360 nm gegen Ansatz 6 messen. Bewahren Sie die Küvetten auf und verwenden Sie für jeden Alkohol jeweils die gleiche Küvette für die zweite Messung. Die Messlösungen in die entsprechenden Reagenzgläser zurückführen und zu jedem Ansatz ADH-Lösung zugeben. Nach einer festen Zeit nochmals die Extinktion der Proben 1- 5 gegen 6 messen. Die Menge der ADH-Lösung und die Inkubationszeit hängen von der Enzymaktivität ab. Erfragen Sie die aktuellen Werte, sie liegen bei ca. 20-100 µl bzw. 10-60 min.

Auswertung:

Von den Extinktionswerten der 2. Messung jeder Probe wird der Wert der Nullprobe (vor ADH-Zugabe) subtrahiert. Die daraus resultierenden Extinktionsdifferenzwerte sind ein Maß für die Umsetzung der getesteten Alkohole.

Geben Sie eine qualitative Wertung über die Spezifität der Hefe-ADH ab!

3.4. Bestimmung von Harnstoff im Harn

Reagenzien (stehen fertig angesetzt aus):

Neßler's Reagenz:

- Lösung I: 20 g NaOH mit Wasser ad 100 ml
- Lösung II: 10 g rotes Quecksilber(II)-iodid und 8 g KI in Wasser ad 100 ml
- Kurz vor Gebrauch 1 Volumenteil Lösung I und 1 Volumenteil Lösung II mischen.
- (NH₄)₂SO₄-Standard: 16,1 mg (NH₄)₂SO₄ mit Wasser ad 100 ml
- Urease: 125 mg Urease in 2,5 ml Glycerin und 2,5 ml Wasser lösen
- 4 % HClO₄ (v/v): 11,4 ml 70 % HClO₄ mit Wasser ad 200 ml

Durchführung:

- Harn im Messkolben 1 : 100 mit Wasser verdünnen (trüben Harn vorher zentrifugieren)
- Folgende Proben in 4 Zentrifugenröhrchen ansetzen für die

Urease-Reaktion

Nr.		Zugabe von: Wasser	Urease	verdünnter Harn
-----	--	--------------------	--------	-----------------

1	Probenleerwert	1,0 ml	0,0 ml	0,0 ml
2	Ammoniakkontrolle	0,0 ml	0,0 ml	1,0 ml
3	Harnprobe 1	0,0 ml	0,1 ml	1,0 ml
4	Harnprobe 2	0,0 ml	0,1 ml	1,0 ml

- gut schütteln
- 15 min stehenlassen
- dann zu allen 4 Ansätzen zur "Enteweißung" 3,0 ml 4 % HClO₄ zugeben
- anschließend nur zum Probenleerwert und zu der Ammoniakkontrolle 0,1 ml Urease zugeben
- alle Gläser gut schütteln und 5 min stehenlassen, dann abzentrifugieren
- Überstände in Reagenzgläser dekantieren und für Ammoniaknachweis verwenden.
(Diese Ansätze sind die Enzymansätze, da in ihnen das Enzym Urease enthalten ist.)

■ Ammoniaknachweis mit Neßler's Reagenz

- ausreichende Menge Neßler's Reagenz frisch mischen (siehe Vorschrift unten)
- folgende Proben in 7 Reagenzgläsern ansetzen:

Nr.	Probe	Zugabe von: Wasser	Überstand nach Enteweißung	(NH ₄) ₂ SO ₄ - Standardlösung	Neßler's Reagenz
1	Probenleerwert	4,8 ml	0,2 ml	0,0 ml	0,1 ml
2	Ammoniakkontrolle	4,8 ml	0,2 ml	0,0 ml	0,1 ml
3	Harnprobe 1	4,8 ml	0,2 ml	0,0 ml	0,1 ml
4	Harnprobe 2	4,8 ml	0,2 ml	0,0 ml	0,1 ml
5	(NH ₄) ₂ SO ₄ -Standard 1	4,8 ml	0,0 ml	0,2 ml	0,1 ml
6	(NH ₄) ₂ SO ₄ -Standard 2	4,8 ml	0,0 ml	0,2 ml	0,1 ml
7	Reagenzienleerwert	5,0 ml	0,0 ml	0,0 ml	0,1 ml

Ammoniumsulfatstandards und Reagenzienleerwert sind die colorimetrischen Ansätze. Alles gut vermischen und innerhalb von 10 min die Extinktion bei 436 nm folgendermaßen ermitteln:

■ Ermittlung der Extinktion bei 436 nm

- Messung der Ammoniumsulfatstandards (Proben 5 und 6) gegen den Reagenzienleerwert (Probe 7)
- Mittelwert aus beiden Werten errechnen (ergibt E_{st})
- Messung der Ammoniakkontrolle (Probe 2) und der beiden Harnproben (Proben 3 und 4) gegen den Probenleerwert (Probe 1)
- Mittelwert der Messwerte der beiden Harnproben bilden und den Messwert für die Ammoniakkontrolle subtrahieren; dieser Wert ist E_{pr} (zur Berücksichtigung des NH₃-Gehaltes des Harns)

■ Berechnung des Harnstoffgehaltes des Harns

Der Ammoniumsulfatstandard (0,2 ml) enthält 0,488 µmol NH₃. Da für den Ammoniaknachweis in 4.1.4.2. nur 0,2 ml des enzymatischen Ansatzes (4,1 ml Gesamtvolumen aus 4.1.4.1. mit 1 ml verdünntem Harn) verwendet wurden (1/20,5) und 2 mol NH₃ einem mol Harnstoff entsprechen, entspricht der Standard 0,488 µmol NH₃ x 1 mol Harnstoff / 2 mol NH₃ x 20,5 = 5 µmol Harnstoff/ml verdünnter Harn. Dann ist:

$$\frac{\mu\text{mol Harnstoff}}{\text{ml Harn}} = \frac{E_{pr}}{E_{st}} \times 5 \times \text{Verdünnungsfaktor des Harns}$$

und

$$\frac{\mu\text{g Harnstoff}}{\text{ml Harn}} = \frac{\mu\text{mol Harnstoff} \times 60}{\text{ml Harn}}$$

Aufgabe:

Berechnen Sie den Harnstoffgehalt von 100 ml Harn in mg.

3.5. Bestimmung von Harnsäure im Harn

Reagenzien:

- Phosphorwolframsäure: 50 g Na-Wolframat in 40 ml 85 % H_3PO_4 und 350 ml dest. Wasser 3 - 6 Stunden mit Rückflusskühler kochen; nach dem Abkühlen mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen
- Sodalösung: 110 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ in dest. Wasser lösen und auf 500 ml auffüllen
- Harnsäure-Standard: 10 mg Harnsäure in dest. Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen (zum Lösen erhitzen!)

Durchführung:

- 1 ml Harn im Messkolben mit dest. Wasser auf 25 ml verdünnen und gut durchmischen.
- 2 ml dieser Lösung entnehmen und nacheinander zufügen: 0,5 ml Phosphorwolframsäure (PW) 4,5 ml Sodalösung 8,0 ml dest. Wasser (Bei Trübung zentrifugieren!)
- Nach 10 min bei 615 nm die Extinktion gegen einen Leerwert mit 2 ml dest. Wasser anstelle der Harnlösung messen.
- Parallel zur Probe wird eine Eichkurve aus einer wässrigen Harnsäure-Standard-Lösung (diese enthält 10 mg Harnsäure/100 ml Lösung) hergestellt: je 1; 2; 5 und 10 ml des Standards mit dest. Wasser zunächst auf 10 ml auffüllen und dann zu allen je 0,5 ml PW und 4,5 ml Sodalösung zugeben; Messung der Extinktion der Eichkurvenwerte gegen den gleichen Leerwert wie die Harnprobe.

Aufgabe

Berechnen Sie den Harnsäuregehalt in mg/100 ml Harn.

3.6. Quantitative DNA-Bestimmung nach DISCHE

Reagenzien:

- 1N HClO_4 : 42,6 ml 70 % HClO_4 mit Wasser ad 500 ml
- DISCHE-Reagenz: 1 g Diphenylamin in 2,5 ml konz. H_2SO_4 lösen und mit Eisessig auf 100 ml auffüllen
- DNA-Standard: 1 mg DNA/ml

Durchführung:

- 1 g Frischhefe mit 5 ml 10 % TCE versetzen und gut suspendieren; Suspension zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Anschließend mit weiteren Lösungsmitteln (je 5 ml) nacheinander suspendieren und zentrifugieren, die Überstände verwerfen: 96 % Ethanol; Ethanol : Chloroform (3 : 1); Ethanol : Ether (1 : 1) und Ether.

- Den verbleibenden Niederschlag mit 3 ml 1 M HClO₄ versetzen und 15 min im Wasserbad auf 70 °C erhitzen, zentrifugieren, den Überstand in ein graduiertes Röhrchen dekantieren, auf 5 ml mit HClO₄ auffüllen und zur DNA-Bestimmung verwenden.
- Für die Bestimmung je 1 ml unverdünntes DNA-Hydrolysat mit je 2 ml DISCHE-Reagenz versetzen, 10 min im Wasserbad kochen.
- Parallel dazu eine Eichkurve mit 0,1; 0,2; 0,5 und 1,0 mg DNA/ml Probevolumen ansetzen sowie für den Leerwert 1 ml 1N HClO₄; diese Ansätze ebenfalls mit 2 ml DISCHE-Reagenz versetzen und kochen.
- Messung der Extinktion aller Proben und der Eichkurvenwerte gegen den Leerwert bei 600 nm.

Aufgabe

Berechnen Sie den DNA-Gehalt der Hefe in mg pro g Frischgewicht!

3.7. Gesamtzuckerbestimmung im Pflanzenextrakt mit Anthron

Herstellung und Vermessen des Pflanzenextraktes

Reagenzien:

Anthron-Reagenz: 36 ml dest. Wasser unter Kühlung vorsichtig mit 104 ml konz. H₂SO₄ versetzen und darin nach dem Abkühlen 280 mg Anthron lösen. Das Reagenz ist so maximal 12 Stunden haltbar.

Durchführung:

- Verwenden Sie frische grüne Blätter für den Versuch. 2,5 g Frischmaterial verlustlos in kleine Würfel schneiden und mit 0,5 g Quarzsand und 0,1 g CaCO₃ und ausreichender Menge 80 % Ethanol im Mörser gründlich zerreiben.
- Den Gewebebrei unter Nachspülen quantitativ in ein Becherglas mit 10 ml, auf 60 °C erwärmten 80 % Ethanol überführen, abdecken und 20 min bei 60 °C im Wasserbad extrahieren.
- Den Überstand vorsichtig durch Dekantieren in einen 25 ml Messkolben überführen und den Rückstand nochmals mit 10 ml 80 % Ethanol extrahieren.
- Die Überstände im 25 ml Messkolben abkühlen und vor Gebrauch mit 80 % Ethanol bis zur Marke auffüllen.

Bestimmung des Gesamtzuckers

Dieser Versuch wird an einem festgelegten Termin durchgeführt (siehe Praktikumsplan). Die Einteilung der Gruppen an diesem Tag erfolgt durch die Assistenten.

Durchführung:

- Herstellung einer Eichkurve aus einer Saccharose-Stammlösung, welche 10 mg reinste, getrocknete Saccharose/100 ml dest. Wasser enthält; davon werden 0,2; 0,4; 0,8 und 1,6 ml jeweils mit dest. Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt. Diese Lösungen enthalten demnach 10, 20, 40 bzw. 80 µg Saccharose pro ml Probevolumen.
- Zur Bestimmung des Zuckergehaltes im Pflanzenextrakt füllen Sie diesen, falls erforderlich, nochmals mit 80 % Ethanol bis zur 25-ml-Marke auf, mischen gut durch und stellen davon einige ml der Verdünnungsstufen 1 : 10 und 1 : 100 her.
- Für die Durchführung der Messung werden 7 Reagenzgläser (für Leerwert, 2 Proben und 4 Eichwerte) mit je 2,5 ml Anthron-Reagenz (Vorsicht beim Pipettieren, nicht Tropfen!) vorbereitet und 5 min im Eiswasser gekühlt. Die Proben müssen ebenfalls vorgekühlt werden. Dann überschichtet man das Anthron-Reagenz in einem Röhrchen

mit 0,5 ml der Probe: dest. Wasser bzw. 4 verschiedene Saccharosestandardlösungen bzw. 1 : 10 und 1 : 100 verdünnter Pflanzenextrakt.

- Nochmals 5 min kühlen und alles gut vermischen. Achten Sie darauf, dass die viskosen Lösungen wirklich gut gemischt sind. Dann 10 min im Wasserbad kochen; 5 min im Eisbad abkühlen und die Extinktion der Proben gegen die Lösung des Leerwertes (Ansatz mit 0,5 ml dest. Wasser) bei 620 nm ermitteln.
- Mit Hilfe der Eichkurve wird der Zuckergehalt des Pflanzenextraktes bestimmt und auf mg Saccharoseäquivalent pro g Frischgewicht umgerechnet.

3.8. Amino-N-Bestimmung mit Ninhydrin

Reagenzien:

- 2,5 % TCE (v/v): 12,5 ml 20 % TCE mit 87,5 ml dest. Wasser mischen
- Ninhydrin-Reagenz (jeden Tag frisch ansetzen!): 0,1 g Ninhydrin in 10 ml Methylglykol lösen; 10 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ zugeben und nach dem Lösen 10 ml Acetat-Puffer zufügen (Acetat-Puffer durch Mischen gleicher Teile 1 M NaOH und 2 M CH_3COOH herstellen).
- Leucin-Stammlösung: 2,62 mg Leucin in etwas 2,5 % TCE lösen und mit TCE auf 20 ml auffüllen.

Durchführung:

- Je 150, 15 und 1,5 μl des Pflanzenextraktes (siehe Gesamtzuckerbestimmung mit Anthon) werden nach Bedarf mit 2,5 % Trichloressigsäure (TCE) auf 150 μl im Reagenzgefäß aufgefüllt; parallel dazu wird eine Eichkurve aus einer Leucin-Stammlösung aufgestellt.

Leucin-Stammlösung:	0 μl	30 μl	75 μl	150 μl
2,5 % TCE:	150 μl	120 μl	75 μl	0 μl
Das entspricht:				
Leucin ($\mu\text{g/ml}$)	0,0	26,2	65,5	131,2
Amino-N ($\mu\text{g/ml}$)	0,0	2,8	7,0	14,0

- Zu diesen Ansätzen gibt man jeweils 375 μl Ninhydrin-Reagenz.
- Sämtliche Ansätze 20 min im Wasserbad kochen, danach sofort kühlen und die Proben mit 60 % Ethanol auf 1,5 ml auffüllen.
- Messung der Extinktion der Proben gegen den Ansatz ohne Leucin-Stammlösung (bei Trübung erst zentrifugieren!) bei 580 nm.

Aufgabe:

Berechnung des Amino-N-Gehaltes im Pflanzenextrakt in mg pro g Frischgewicht des verwendeten Pflanzenmaterials.

3.9. Proteinbestimmung nach der BIURET-Methode

Reagenzien:

- physiolog. Kochsalzlösung: 0,9 g NaCl in 99,1 ml dest. Wasser lösen

- BIURET-Reagenz (nach WEICHSELBAUM): 15 g Seignette-Salz (K-Na-Tartrat) in 400 ml 0,2 M carbonatfreier NaOH lösen, danach 5 g CuSO₄ zugeben und lösen; dann Zugabe von 5 g KI und lösen; anschließend mit 0,2 M NaOH auf 1000 ml auffüllen
- 1 % Serumalbumin (w/v): 1 g Serumalbumin in 99 ml physiol. Kochsalzlösung lösen

Durchführung:

- 2 g Hefe mit etwas Quarzsand und einigen ml physiol. Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) im Mörser gut zerreiben: den Gewebebrei quantitativ in ein 10 ml Messkolben überführen und mit NaCl-Lösung bis zur Marke auffüllen; einen Teil davon zentrifugieren
- von der gewonnenen Proteinlösung gibt man 0,2; 0,4 und 1,0 ml in Reagenzgläser und füllt nach Bedarf mit NaCl-Lösung auf 1,0 ml auf
- für die Eichkurve verwendet man 80 µl, 160 µl und 240 µl einer 1 % BSA (Rinderserumalbumin)-Lösung, füllt auf 1,0 ml mit NaCl-Lösung auf und gibt zu allen Proben je 1,0 ml BIURET-Reagenz, für den Leerwert verwendet man 1,0 ml NaCl-Lösung und 1,0 ml BIURET-Reagenz
- nach 30 min wird die Extinktion der Proben und der Eichkurve bei 540 nm gegen den Leerwert gemessen

Aufgabe:

Berechnen Sie den Gehalt an Protein in der Frischhefe in mg pro g Frischgewicht!

3.10. pH-Abhängigkeit des Vis-Spektrums und Metallkomplexe eines Pflanzenfarbstoffs aus *B. oleracea*

(Blüten)pflanzen bilden eine Vielzahl von Farbstoffe. Die Farbstoffe des Rotkohls (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *rubra* [L.](#)) sind im Wesentlichen Anthocyane mit geringen Modifikationen des Flavens und verschiedenen Glycosylierungen.

Spektral verhält sich der Rotkohlextrakt bei den benutzten Bedingungen jedoch wie ein einheitlicher Farbstoff. Im Versuch wird die pH-Abhängigkeit des Anthocyan qualitativ und die Komplexbildung mit Al³⁺-Ionen quantitativ bestimmt.

Materialien:

Frischer Rotkohl

verschiedene Puffer mit pH-Werten von 4.0 bis 8.0 (Herstellung siehe unten)

10 ml Wasser mit einem Tropfen HCl, pH 1,5

10 ml Wasser mit mehreren Tropfen NaOH-Lsg, pH 12,6

99,8%igen Ethanol

1000 mM AlCl₃-Lsg

neun 50-ml-Falcon-Röhrchen

28 15-ml Falcon-Röhrchen

Glasstab

1,5-ml Reaktionsgefäße

Pipetten und Spitzen

Aufgaben

1. Herstellen der Puffer

150 ml einer Lösung mit 30 mM Citronensäure, 30 mM NaH₂PO₄ und 30 mM Borsäure werden mit NaOH stufenweise hochtitriert. Jeweils bei pH 4.25, 5.5, ... 9.0 und 10.0 (Tab. 1) werden 10 ml abgenommen. Durch das schrittweise Entnehmen der verschiedenen Puffer ist die Konzentration nicht genau kontrollierbar! Für diesen Versuch sind jedoch nur der pH und

die Pufferwirkung wichtig. Für den pH-Wert 1,5 wird stark verdünnte HCl-Lösung genommen (ein Tropfen 25%iger Lösung in 10 ml Wasser), für den pH 12,5 werden 8 Tropfen einer 2 M NaOH-Lösung in 10 ml Wasser gegeben.

2. Extraktion der Anthocyane und pH-Abhängigkeit

- Beschriften Sie die 50-ml Röhren mit 1-9.
- Wiegen Sie pro Röhren 0,1 g kleingerissene frische Rotkohlblätter ein.
- Geben Sie gemäß Tabelle 1 vier Milliliter des entsprechenden Puffers in die Röhren.
- Setzen Sie einen Milliliter Ethanol zu und zerstoßen Sie die Blätter mit dem Glasstab.
- Lassen Sie den Ansatz ca. 15 Minuten stehen, ggf. zwischendurch noch einmal mit dem Glasstab behandeln. Beschriften Sie je 3 15-ml Röhren mit 1-9.
- Überführen Sie die Ansätze in je eines der zugehörigen 15-ml Röhren. Zentrifugieren Sie die Ansätze bei 100% Leistung für 15 min in der Hettich EBA 8S Zentrifuge.
- Überführen Sie die Überstände in neue 15-ml Röhren.
- Entnehmen Sie je einen Milliliter aus dem Röhren und überführen Sie ihn in ein entsprechend beschriftetes 1,5-ml Reaktionsgefäß.
- Zentrifugieren Sie die Gefäße bei 13 000 Upm für 10 Minuten.
- Überführen Sie die Überstände in neue 1,5-ml Reaktionsgefäße.
- Dokumentieren/beschreiben Sie die Farbunterschiede.

Nr.	pH
1	1,5
2	4,25
3	5,5
4	6,75
5	7,5
6	8,0
7	9,0
8	10,0
9	12,5

Tabelle 1: Zuordnung Probennummern und Puffersubstanzen

3. Metallkomplexbildung

- Überführen Sie 500 µl jeder Lösung in ein entsprechend beschriftetes 15-ml Röhren und geben Sie 4,5 ml des zugehörigen Puffers dazu.
- Überführen Sie je einen Milliliter in ein neues 1,5-ml Reaktionsgefäß und geben Sie hierzu 10 µl einer 1000 mM AlCl₃-Lösung. Schwenken Sie die Gefäße.
- Beobachten Sie die Reaktion und dokumentieren/beschreiben Sie die Farbunterschiede.

4. Bestimmung einer Bindungskonstante

- Überführen Sie einen Milliliter des verdünnten Extrakts Nr. 2 in ein neues 1,5-ml Reaktionsgefäß
- Stellen Sie eine 100 mM, 10 mM, 1 mM und 0,1 mM AlCl₃-Lösung durch Verdünnung der 1 M Lösung her (1,5-ml Reaktionsgefäße)

- Messen Sie am Photometer mit einer Plastik-Küvette ein Spektrum im Wellenlängenbereich von 340 bis 800 Nanometer. Messen Sie 1 ml Puffer als Basislinie. Küvette danach entleeren und mit etwas Wasser spülen, mit Papiertuch vorsichtig abtupfen. Messen Sie anschließend den Extrakt.
- Geben Sie entsprechend dem unten dargestellten Pipettierschema die erste in Spalte 1 genannte Menge der entsprechenden Lösung in die Küvette, mischen Sie vorsichtig mit einem Kunststoffstäbchen und messen Sie erneut. Geben Sie (ohne die Küvette zu leeren) die nächste in Spalte 1 genannte Menge dazu, mischen und messen Sie. Wiederholen Sie alle Schritte bis zum Ende des Pipettierschemas. Am Ende sollten alle Spektren übereinandergelegt sein. Speichern Sie die Spektren ab.

Zuzugebendes Volumen in μl	Lösung mM AlCl_3
0	0,1
5	0,1
5	0,1
10	0,1
15	0,1
20	0,1
5	1
10	1
15	1
20	1
5	10
10	10
15	10
20	10
5	100
10	100
15	100
20	100
5	1000
10	1000
15	1000
20	1000

Auswertung

Beschreiben Sie die Farbunterschiede bei verschiedenen pH-Werten. Wo liegen isosbestische Punkte und was bedeutet das für die Zusammensetzung der Lösung?

Informieren Sie sich, wie die unterschiedlichen Farben entstehen. Warum gibt es einen Farbumschlag bei Zugabe von AlCl_3 ? Ist dies auch bei zweiwertigen Metallionen zu erwarten?

Für die Berechnung einer Al^{3+} -Bindungskonstante wählen Sie die Kurven, die einen isosbestischen Punkt bei ca. 520 nm haben.

Tragen Sie Änderung der Absorption gegen $[\text{Al}^{3+}]$ in einem Graph als Punkte auf. Tabellieren Sie zugegebenes Volumen an Al^{3+} -Lösung, Gesamtvolumen, zugegebene Menge an Al^{3+} , Konzentration an Al^{3+} , Verdünnung der Startlösung, gemessene Absorption, auf das Ausgangsvolumen zurückgerechnete Absorption. Als Wellenlänge wählen Sie den günstigsten unter 500, 520, 550, 600, 650 nm.

Berechnen Sie die Komplexbildungskonstante für den 1:1 Komplex und den 1:2 Komplex.

Warum gilt die Vereinfachung $[\text{Al}^{3+}]_{\text{frei}} \sim [\text{Al}^{3+}]_{\text{gesamt}}$? Tipp: Schätzen Sie die Farbstoffkonzentration mit $\epsilon_{\text{max}} \sim 30\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ab.

Die gefitteten Werte für die Absorption (1:1 und 1:2 Komplex) bei verschiedenen $[Al^{3+}]_{gesamt}$ tragen Sie als Linie ebenfalls in denselben Graph ein.

Welches Komplexmodell passt besser basierend auf Ihren Fits? Wie könnte man dies experimentell besser nachprüfen?

Zusatzinformation: MW(Cyanidin) 286,25 g/Mol

Auswertung für den den 1:1 Komplex:

Die gefittete Kurve für das 1:1 Modell wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$A(Al) = \frac{A_F + [Al]_{ges} K_{AlF} A_{AlF}}{1 + [Al]_{ges} K_{AlF}} \quad (1)$$

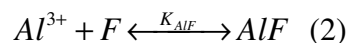
$A(Al)$: Absorption als Funktion der $[Al^{3+}]_{gesamt}$

A_F : Absorption, wenn der Farbstoff frei vorliegt

A_{AlF} : Absorption, wenn der Farbstoff komplexiert vorliegt

Herleitung:

Für die Reaktion



F: freier Farbstoff

AlF: 1:1 Komplex von Al und Farbstoff

gilt das Massenwirkungsgesetz

$$K_{AlF} = \frac{[AlF]}{[Al]_{fr} [F]_{fr}} \quad (3)$$

Die Bildung von Protonen kann wegen der Pufferung vernachlässigt werden.

Zur Absorption trägt nur freier und komplexierter Farbstoff (F_{fr} , AlF) bei:

$$A(Al) = \epsilon_F [F]_{fr} d + \epsilon_{AlF} [AlF] d \quad (4)$$

Mit den Massenbilanzen

$$[F]_{ges} = [F]_{fr} + [AlF] \quad (5)$$

und

$$[Al]_{ges} \approx [Al]_{fr} \quad (6)$$

Al_{ges} : gesamtes Al^{3+} in der Lösung

Al_{fr} : freies, nicht komplexiertes Al^{3+} in der Lösung

Kann man $[F]_{fr}$ aus (5) in (3) einsetzen und nach $[AlF]$ auflösen:

$$[AlF] = \frac{K_{AlF} [F]_{ges} [Al]_{ges}}{1 + K_{AlF} [Al]_{ges}} \quad (7)$$

(7) in (5) ergibt:

$$[F]_{fr} = \frac{[F]_{ges}}{1 + K_{AlF} [Al]_{ges}} \quad (8)$$

(7) und (8) in (4) eingesetzt ergibt:

$$A(Al) = \epsilon_F \frac{[F]_{ges}}{1 + K_{AlF} [Al]_{ges}} d + \epsilon_{AlF} \frac{K_{AlF} [F]_{ges} [Al]_{ges}}{1 + K_{AlF} [Al]_{ges}} d \quad (9)$$

$\epsilon_F [F]_{ges} d$ und $\epsilon_{AlF} [F]_{ges} d$ lassen sich mit A_F und A_{AlF} abkürzen:

$$A(Al) = A_F \frac{1}{1 + K_{AlF} [Al]_{ges}} + A_{AlF} \frac{K_{AlF} [Al]_{ges}}{1 + K_{AlF} [Al]_{ges}} = \frac{A_F + K_{AlF} [Al]_{ges} A_{AlF}}{1 + K_{AlF} [Al]_{ges}} \quad (10) = (1)$$

A_F : Absorption, wenn der gesamte Farbstoff frei vorliegt

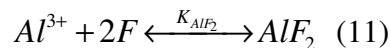
A_{AlF} : Absorption, wenn der gesamte Farbstoff als Komplex vorliegt

Parameter sind also K_{AlF} , A_F und A_{AlF} .

Anfangswerte für A_F und A_{AlF} lassen sich aus den Messwerten direkt ablesen (unteres und oberes Plateau). K_{AlF} entspricht ungefähr der $[Al^{3+}]$ bei halber Komplexbildung.

Auswertung für den den 1:2 Komplex:

Um die Reaktion



F: freier Farbstoff

AlF_2 : 1:2 Komplex von Al und Farbstoff

zu modellieren, fitten Sie an

$$A(Al) = \varepsilon_F [F]_{fr} d + \varepsilon_{AlF_2} [AlF_2] d \quad (12)$$

mit

$$[F]_{fr} = \frac{-1 + \sqrt{1 + 8[Al]_{ges} K_{AlF_2} [F]_{ges}}}{4[Al]_{ges} K_{AlF_2}} \quad (13)$$

und

$$[AlF_2] = \frac{[F]_{ges} - [F]_{fr}}{2} \quad (14)$$

Die Herleitung bleibt dem Interessierten überlassen.

Parameter sind K_{AlF_2} , $\varepsilon_F d$, $\varepsilon_{AlF_2} d$ und $[F]_{ges}$. $[F]_{ges}$ lässt sich fast nicht fitten (und beeinflusst das Ergebnis kaum), setzen Sie sie auf 0,01 mM fest. Die Extinktionskoeffizienten liegen in der Größenordnung von $10 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, d.h. $\varepsilon d \approx 10 \text{ mM}^{-1}$. Als Startwert für K_{AlF_2} wählen Sie 1000 mM^{-2} . $[Al]_{ges}$ ist dieselbe wie für den 1:1 Komplex.

4. Verfahren

4.1. Elektrophoretisches Trennverfahren

Zahlreiche Biomoleküle tragen ionisierbare Gruppen und können deshalb in Lösung als Kationen oder Anionen vorliegen. Außerdem weisen Moleküle mit ähnlichen Ladungen aber unterschiedlicher relativer Molmasse verschiedene Ladungsdichten auf. Diese Eigenschaften bilden die Voraussetzung für die Wanderung solcher Ionen in einem elektrischen Feld (Prinzip der Elektrophorese).

Unter Elektrophorese versteht man die Bewegung geladener Moleküle in einer meist wässrigen Lösung unter dem Einfluss eines äußeren elektrischen Feldes. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Kationen (+) zur Kathode (-) und der Anionen (-) zur Anode (+) hängt dabei von der anliegenden Feldstärke und von der elektrophoretischen Beweglichkeit der Moleküle ab. Die Bewegungskraft, die auf ein kugelförmiges Teilchen im homogenen elektrischen Feld bei Abwesenheit von Salzen einwirkt, entspricht dem Reibungswiderstand, den das Teilchen im Gel überwinden muss. Die elektrische Kraft steigt proportional zur Größe (Länge) der Proteine, da diese gleichmäßig mit Dodecylsulfat beladen sind, die Reibungskraft steigt jedoch überproportional zur Größe. Daher wandern die großen Proteine langsamer, die kleinsten Teilchen (blaue Markermoleküle) wandern an der Front.

Durchführung einer SDS-Page-Elektrophorese :

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird mit der Miniprotean-3-Gelapparatur von Bio-Rad durchgeführt. Es ist sauberes und ordentliches Arbeiten geboten! Die Apparaturen müssen nach jedem Gebrauch abgewaschen und mit dest. Wasser gespült werden. Vorsicht ist geboten, da die Teile leicht zerbrechlich sind! Beim Handhaben der acrylamidhaltigen Lösungen und der Gele sind Handschuhe zu tragen! Nach vollständigem Auspolymerisieren der Gele enthalten diese kein Acrylamid mehr, nur noch Polyacrylamid, dies ist nach wenigen Stunden jedoch noch nicht gewährleistet!

Die Apparatur wird vorschriftsmäßig nach den Anweisungen der Praktikumsbetreuer zusammengebaut. Dann werden nacheinander die Gele angesetzt und in die Apparaturen eingefüllt. Bereiten Sie Sammel- und Trenngel beide bis auf die Starter (TEMED und APS) vor. Geben Sie die Starter erst kurz vor dem Gießen des jeweiligen Geles zu.

1. SDS-Trenngel-Präparation nach LAEMMLI

Pipettierschema Trenngel (12 %)

	Für 2 Gele	Angesetzt im Becherglas
Dest. Wasser	4,7 ml	
Glycerol	2,0 ml	
1,5 M TRIS-HCl, pH = 8,8	5 ml	
10 % SDS	200 µl	
30 % Acrylamid/BIS	8,0 ml	Vorsicht Gift!
TEMED	50 µl	
10 % APS	100 µl	

- 30 % Acrylamid/BIS und 10% APS stehen im Kühlschrank!
- SDS-Trenngel und Sammelgel gleichzeitig ansetzen
- SDS-Trenngel in die Apparatur einpipettieren, ca. 3/4 voll, ca. 6 ml je Gel
- Wenn das Trenngel zu schnell polymerisiert (bevor es mit dem Sammelgel überschichtet werden konnte), Trenngel wiederholen. Dabei weniger TEMED und APS benutzen und direktes Sonnenlicht vermeiden (Radikalstarter für die Polymerisation!).

2. SDS-Sammelgel-Präparation nach LAEMMLI

Pipettierschema Sammelgel (4 %)

	Für 2 Gele	Angesetzt im Becherglas
Dest. Wasser	6,0 ml	
0,5 M TRIS-HCl, pH = 6,8	2,5 ml	
10 % SDS	100 µl	
30 % Acrylamid/BIS	1,3 ml	Vorsicht Gift!
TEMED	10 µl	
10 % APS	50 µl	

- SDS-Sammelgel vorsichtig auf das noch nicht polymerisierte, flüssige Trenngel pipettieren, ca. 3 ml je Gel
- Kamm zwischen beide Glasplatten einsetzen

- nach ca. 30-45 min sind beide Gele fest
 - die Apparatur mit den Glasplatten und dem Gel aus dem Gießstand entnehmen
 - dieses in das Modul, welches in den Laufmitteltank eingebaut wird, einbauen (lt. Anordnung der Praktikumsbetreuer)
 - Innere Kammer nun mit SDS-Laufmittel füllen (192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 0,1 % SDS). Äußere Kammer nur bis zur Unterkante der Gelplatten füllen. Falls die innere Kammer ausläuft, auch die äußere Kammer auffüllen.
 - Kämme vorsichtig aus den Glasplatten ziehen. Oberer Gelrand sollte unter der Wasseroberfläche sein, die Taschen füllen sich jetzt beim Herausziehen der Kämme mit Laufmittel.
 - die Taschen vorsichtig mit SDS-Laufmittel ausspülen.
3. **Probenvorbereitung:**
- von jeder Proteinproben (Lysozym, BSA, GFP) zwei Eppis mit 10 µl vorbereiten
 - zu jedem Eppi 10 µl SDS-Page-Probenpuffer zugeben
 - eines der Eppis für jedes Protein für 10 min in Thermostaten bei 95 °C stellen
 - nach 10 min Eppis rausnehmen und auf Eis stellen
 - Eppis kurz anzentrifugieren
 - je 10 µl von 1 Größenmarker und 6 Proteinproben auf die Taschen eines Geles auftragen
4. **Probenauftrag und Gellauf**
- nun werden die vorbereiteten Proteinproben einpipettiert
 - von jeder Proteinprobe 10 µl in die Taschen pipettieren
 - Elektrophoresekammer verschließen, dabei auf die Polung achten! (rot zu rot und schwarz zu schwarz)
 - Elektrophorese bei Raumtemperatur und einer Spannung von 160 Volt laufen lassen - ca. 60 min - 90 min
 - nach Beendigung Apparaturen auseinander bauen und die Gele mit der Coomassiefärbung anfärben
5. **Coomassiefärbung**
- Coomassie in die Färbeschale geben (ca. 20 ml)
 - Gele 30 min in Coomassie färben
 - Coomassie abgießen und in die vorgesehene Flasche gießen
 - Gele nun mit Entfärbelösung (Laborjargon: Hot & Chilli) entfärben (ca. 60 min)
 - Gele dann mit dest. Wasser waschen
 - anschließend können die Gele fotografiert oder eingeschweißt werden
 - Entfärbelösung abgießen und in die vorgesehene Flasche geben
6. Färbung von Glycoproteinen (überspringen)
- J. Agr. Food Chem. 1993, 41, 896-898
 - Gel fixieren
 - Mit Periodat oxidieren
 - Mit Schiffschem Reagenz färben
7. Alle gebrauchten Teile der **Apparatur säubern** und mit dest. Wasser spülen!
8. **Photographie** der Gele
- Gel von den Platten abnehmen, Trenngel entfernen, Orientierung markieren (z.B. Ecke links unten abtrennen)
 - Photographie des Gels in bekannter Orientierung nach Anweisung des Betreuers
9. **Auswertung**

- Beschriften Sie die Spuren des Gels (1 2 3 ...) und bezeichnen Sie diese (z.B. 1 Rohextrakt, 2 Fraktion 10, 3 Fraktion 13, 4 Marker). Orientieren Sie das Gel so, dass die Laufrichtung von oben nach unten geht.
- Da die Einzelproteine im Marker vorkommen, können Sie die Größen bestimmen. Bei der Proteinreinigung (P-Versuch) schätzen Sie die Proteingröße ab.
- Die Proteine im Marker liegen denaturiert vor. In welchen Proben (wie behandelt) liegen die Proben ebenfalls denaturiert vor (gleiche Höhe der Bande), in welchen nicht. Sind die nicht denaturierten (nativen) Proteine größer oder kleiner als die denaturierten? Was könnte der Grund sein?

4.2. Kristallisation von Proteinen

Vorbereitung: Erstellung von Pipettierschemata für die u. a. Ansätze

Im Praktikum werden Kristallisationsansätze nach der Methode der Dampfdiffusion mittels hängendem Tropfen durchgeführt. Zur Kristallisation werden Zellkulturplatten verwendet, die jeweils 6 x 4 Vertiefungen (Wells) für die Reservoirlösungen enthalten. Für alle Versuche soll das Volumen der Reservoirlösung 500 µl betragen, soweit nicht anders beschrieben. Auf dem Deckgläschen werden 3 µl Proteinlösung und 3 µl Reservoirlösung gemischt. Beschriften Sie die Kristallisationsplatten mit "Praktikum", der Gruppennummer und dem Versuch (Lysozym, TetR, GFP).

Auswertung: Notieren Sie, in welchen Vertiefungen Kristalle gewachsen sind, und wieviele (z.B. einzelne (1-3), wenige (4-10), viele (>10)). Übersichtlich ist das in einer 6 x 4 Tabelle zu zeigen. Versuchen Sie Tendenzen zu erkennen: Bei niedrigem pH wachsen mehr Kristalle als bei hohem, ... oder ähnlich. Bei einer Wertung mit ‚kristallisiert besser‘ o.ä. bedenken Sie, dass das Ziel wenige große Kristalle sind.

■ Kristallisation von Lysozym, Fällung mit Salz und organischem Lösungsmittel

Dieser Versuch dient der Charakterisierung des Einflusses des Fällungsmittels (Konzentration des Salzes bzw. des organischen Lösungsmittels) auf die Kristallbildung von Lysozym. Eine solche Versuchsreihe würde man typischerweise durchführen, wenn erste Kristallisationsbedingungen aus einem systematischen Screen oder Zufallsscreen bereits ermittelt wurden. Weiterhin sollen hier Kristalle für weitere Übungen im Praktikum gezüchtet werden.

Stammlösungen:

- 20 mg/ml Lysozym
- 3,0 M NaCl
- 100 % 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD)
- 1,0 M Natriumacetatpuffer (NaOAc), pH 4,5
- 1,0 M Tris/HCl, pH 8,0

Erstellen Sie ein Pipettierschema, wobei als Fällungsmittel 1) NaCl mit einer Konzentration von 0,60 M bis 1,2 M in Schritten von 0,15 M und 2) MPD mit einer Konzentration von 55 % bis 75 % in 5%-Schritten verwendet wird. Beide Fällungsmittel werden jeweils mit folgenden Puffern gemischt: 100 mM NaOAc, pH 4,5, oder 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 (insgesamt also 20 Bedingungen). Die Proteinkonzentration wird konstant gehalten.

Kristallisation von TetR (tetracycline repressor), Präzipitant- und pH-Abhängigkeit

Für die Wahl des Proteins den Assistenten fragen. Ziel dieses Versuches ist die Charakterisierung des Einflusses der Präzipitantkonzentration (MPD, DMSO und EtOH bzw. Ammoniumsulfat) und des pH-Wertes auf die Kristallisation.

Erstellen Sie ein Pipettierschema, wobei die Konzentration an Präzipitant und der pH variiert werden. Die Puffer sollen jeweils eine Endkonzentration von 50 mM haben.

Stammlösungen zur TetR Kristallisation:

- 5-10 mg/ml Protein (TetR)
- 3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 1,0 M Pufferlösung Tris/HCl pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0
- 1,0 M Pufferlösung HEPES/NaOH pH 7,0
- 1,0 M Pufferlösung MES pH 6,5
- 3 M MgCl_2
- 4 M NaCl

TetR: pH Wert von pH 6,5 bis 9,0 in 0,5er Schritten

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentration von 0,7 bis 1,0 M in 0,1 M Schritten

allen Lösungen wird 200 mM NaCl und 3 mM MgCl_2 zugesetzt