

Dünnschichtchromatografie (DC1) von Eiweißen (Aminosäure)



I PRODUKTUMFANG

1. Produktbeschreibung

- a) Dieser Versuch vertieft verschiedene bedeutsame Grundkenntnisse:
- Das Hypophysen-Hormon Ocytocin als ein Nonapeptid (Peptid aus 9 Aminosäuren)
 - Bestimmung der Aminosäuren, die das Hormon aufbauen.
- b) Selbsttätige Durchführung des Versuchs durch Schüler; Möglichkeit der Einführung in die bidirektionelle Chromatographie.

Wichtige Anmerkung!!!

Dieses Versuchs-Kit lässt Ihnen die Wahlmöglichkeit zwischen den zwei Methoden, deren Techniken sind nicht sehr verschieden. Vor der Durchführung der bi-direktionellen DC sollte die unidirektionelle DC jedoch beherrscht werden. Bereits vor dem Versuch ist festzulegen, welchen Erkenntniszwecken er dienen soll und welche praktischen Fertigkeiten vermittelt werden sollen: Bei der unidirektionellen Chromatographie steht im Vordergrund zu zeigen, dass es sich um ein Polypeptid handelt; die bidirektionellen Chromatographie zeigt die Aminosäuren auf, aus denen das Hormon besteht.

2. Überprüfung der Hormon-Zusammensetzung:

Die Hydrolyse des Hormons Oxytocin ist sehr schwierig, da kovalente, extrem stabile Dischwefel-Bindungen (Cys-Cys) getrennt werden müssen. Dazu muss das Hormon

normalerweise in saurem Milieu auf 110°C in einem Vakuum für eine lange Zeit erhitzt werden. Dieses Versuchs-Set umgeht das Problem folgendermaßen: Die grundlegenden Aminosäuren, aus denen das Hormon besteht, werden lösungsbereit geliefert (Flasche "Ocytocin"), um sofort eine DC durch-laufen zu können.

II VORBEREITUNGEN

1. Vorbereitung der Lösung aus dem hydrolysierten Hormon durch Zugabe von 5 ml destilliertem Wasser in die Flasche "Ocytocin".
2. Unidirektionelle DC:
Einfüllen des Laufmittels bis ungefähr 1 cm in die Chromatographiekammer und Deckel schließen (die Atmosphäre im Gefäßinneren muss gesättigt sein).
3. Bidirektionelle DC:
Vorbereitung des Lösungsmittels für die Chromatographie
A) Erstes Laufmittel: Die Inhalte der 3 Flaschen werden gemischt (100 ml) und ungefähr 1 cm hoch in die Chromatographiekammer gefüllt. Deckel schließen (die Atmosphäre im Gefäßinneren muss gesättigt sein).
B) Zweites Laufmittel: Inhalt der Flasche "2. Lösungsmittel: Phenol" wird unter dem Abzug erwärmt (ca. 5 min) und so verflüssigt. Zugabe von 25 ml destilliertem Wasser bis zur völligen Lösung und Auffüllen auf 100 ml. Dieses Lösungsmittel darf höchstens 4 Tage aufbewahrt werden.

Anmerkung!!!

Die Haltbarkeit kann durch Lagerung in einer gut geschlossenen braunen Flasche verlängert werden.

4. Vorbereitung des Entwicklers zur Sichtbarmachung der Eiweiße befolgen Sie die Anleitung des Entwicklers und füllen sie das Reagenz in eine Sprühflasche um.
5. Vorbereiten der DC-Platten: Platten in je 4 Teile (10x10 cm) schneiden und im Ofen oder Brutschrank (100°C, 20-30min) Dehydratisieren (= aktivieren)

Inhalt:

- 10 Vergleichs-Aminosäuren
- DC-Platten (20x20 cm)
- Mikrokapillaren 2 µl
- Sprühflasche
- Föhn
- Brutschrank
- Entwickler zur Anzeige der Eiweiße
- destilliertes Wasser
- DC-Kammer mit Deckel

für die unidirektionelle DC:

Dünnschichtchromatografie (DC1) von Eiweißen (Aminosäure) - Best.- Nr. 201.3275

- Lösungsmittel für die Eiweiße (100 ml)

für die bidirektionelle DC:

- 2 Lösungsmittel (je 100 ml)

III VERSUCH

1. Versuchsprinzip

Eine Dünnschichtchromatographie wird auf Silicagel-Platten durchgeführt. Dieses Gel ermöglicht die Migration der Lösungen, wobei die Silica-Kügelchen die Funktion eines Molekularsiebs übernehmen. Zusammen mit einem Lösungsmittel führt es zur Trennung der Moleküle nach unterschiedlichen Kriterien (Größe, Löslichkeit, Adhäsion).

Die bidirektionelle DC wird angewandt, wenn die zu untersuchende Lösung mehrere gleich schnell wandernde Substanzen enthält (die daraus abgeleitet den gleichen Rf-Wert haben). Nach dem ersten Lauf wird die Platte um 90° gedreht und eine weitere Migration mit einem anderen Lösungsmittel durchgeführt.

2. Anleitung für die unidirektionelle DC:

- Eine DC-Platte (5x5 cm) wird im Ofen (20-30 min, 100°C) aktiviert.
- Mikrokapillare mit der Hydrolysat-Lösung befüllen
- Mehrfache Auftragung der Probe auf einen Punkt (Spot) der DC-Platte („Startlinie“).
- Gleichmaßen mit den Vergleichs-Aminosäuren vorgehen. Jede Schülergruppe kann unterschiedliche Lösungen erhalten.
- Einbringung der Platte in die DC-Kammer, die das Laufmittel für die Eiweiße enthält. (Das Lösungsmittel darf die Spots nicht erreichen.)
- Migration: ca. 30 min

3. Anleitung für die bidirektionelle DC:

a) erster DC-Lauf

Das Verfahren entspricht der unidirektionellen DC, wobei das Laufmittel Nr. 1 verwendet wird und lediglich ein Oxytocin-Spot aufgetragen und keine Vergleichs-Aminosäuren aufgetragen werden. Nach 2-3 Stunden Entnahme der Platte und Trocknung bei Raumtemperatur (Erwärmung bewirkt die Verflüchtigung bestimmter Aminosäuren). Die Lösungsmittelfront kann Verunreinigungen aufweisen (gelb-orange); diese Bande kann abgeschnitten werden.

b) zweiter DC-Lauf

Einbringen der Platte in die mit Laufmittel 2 gefüllte Kammer (um 90° gedreht). Mindestens zwei Stunden wandern lassen. Entnahme der Platte. An der Luft trocknen lassen (Achtung: Bei Temperaturen unter 27°C verflüchtigen sich bestimmte Aminosäuren).

Dünnschichtchromatografie (DC1) von Eiweißen (Aminosäure) - Best.- Nr. 201.3275

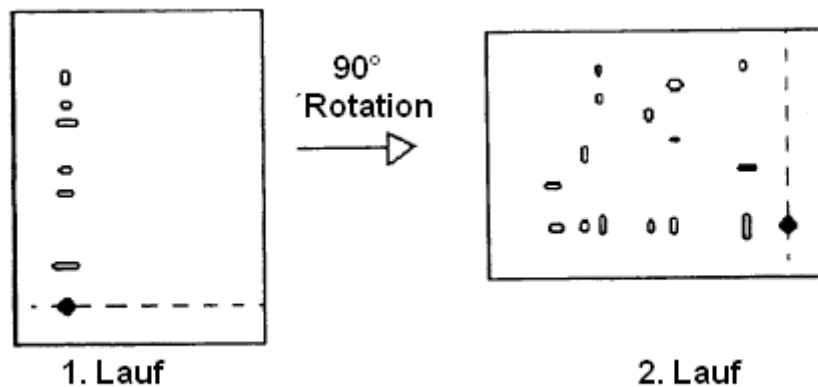


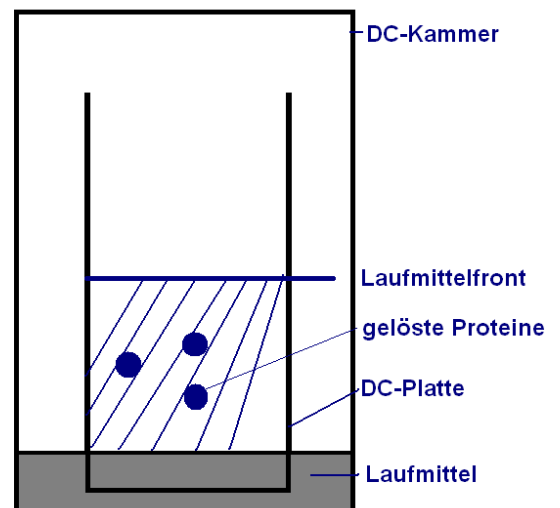
Abbildung 1: Schematische Darstellung der bidirektionalen DC

Parallel zu der zweiten DC wird eine Wanderung der Vergleichs-Aminosäuren auf einer weiteren Platte durchgeführt (Vorbereitung gemäß Angaben in III 2.) unter Verwendung von Laufmittel 2. Der Vergleich der beiden DC-Platten (Auftrennung der Aminosäuren von Ocytocin auf einer Platte und Vergleichs-Aminosäuren auf einer oder mehreren anderen Platten) ermöglicht es, die Aminosäuren zu bestimmen, aus denen das Hormon aufgebaut ist. Dies gilt jedoch nur für Versuchsdurchführungen, die am gleichen Tag und auf den gleichen Platten durchgeführt werden (gleiche Versuchsbedingungen).

Chromatographie

Trennen der Bestandteile einer Lösung: Das Laufmittel durchläuft auf der Platte eine Distanz D gemessen von einem Ausgangspunkt („Startlinie“). Ein Molekül durchläuft die Distanz d während der gleichen Zeit: Die Distanz ist abhängig von:

- dem Lösungsmittel
- der Temperatur
- der Molekülmasse



Chromatographie nach der Anfärbung

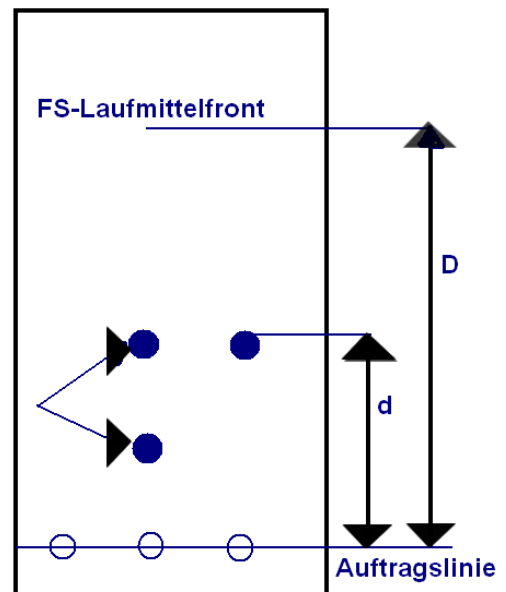
Die Einfärbung der Moleküle ist unverzichtbar, um ihre Position zu erkennen und zu bestimmen.
Das Verhältnis $R_f = d/D$ ist für eine gegebene Substanz charakteristisch (bei gleichem Lösungsmittel und gleicher Temperatur). FL = Front des Lösungsmittels, Spots nach der Färbung:
1 Spot = 1 Molekül

4. Entwicklung des Chromatogramms:

Färbemittel/ Entwickler über der Platte (Chromatogramm) versprühen und Spots markieren, da einige schnell wieder verschwinden. Ca. 5 min trocknen (15 min bei einer bidirektionellen DC).

Die Flecken repräsentieren die unterschiedlichen getrennten Substanzen.

Spots nach Anfärben:
1 Spot = 1 Molekül



5. Auswertung der Ergebnisse: Identifikation der Substanzen

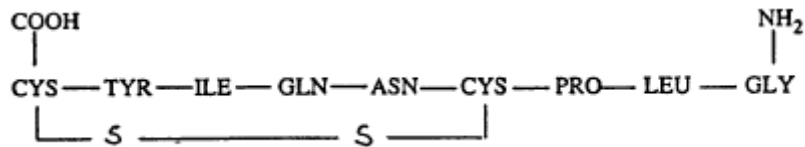
Vergleich der Laufstrecke der Proteinspots mit denen der Vergleichslösungen (Vergleichs-Aminosäuren). Ausrechnen des R_f -Werts und Vergleich mit der R_f -Wert-Tabelle der Substanzen (siehe Tabelle, in ansteigender Reihenfolge).

Moleküle	
1. Tyrosin	8. Glycin
2. Lysin	9. Glutaminsäure
3. Cystein	10. Alanin
4. Arginin	11. Isoleucin
5. Asparaginsäure	12. Leucin
6. Glutamin	13. Phenylalanin
7. Prolin	

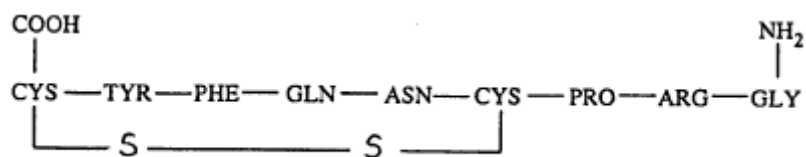
IV KOMMENTAR

Ein Vergleich der Polypeptid-Strukturen der Hypophysen-Hormone Ocytocin und Vasopressin kann sehr interessant sein. Trotz einer nahezu identischen Polypeptidkette sind die Funktionen der zwei Hormone unterschiedlich. Grund dafür ist die unterschiedliche Anordnung der grundlegenden Aminosäuren: 2 Aminosäuren, die nicht zur gleichen Familie gehören, verursachen eine Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins und somit seiner Funktion. Dies ist der Fall bei Ocytocin und Vasopressin.

Ocytocin (Säugetier)

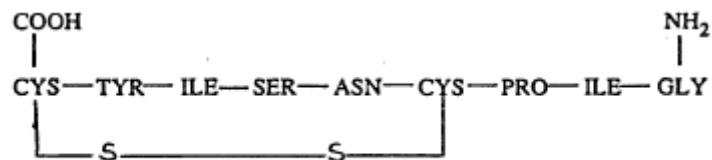


Vasopressin (Säugetier)

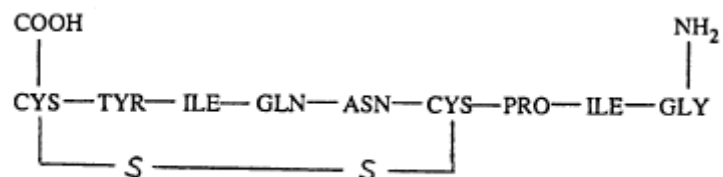


Wenn sich jedoch eine Aminosäure in der gleichen Polypeptid-Kette an der Stelle einer anderen befindet, die der gleichen Familie angehört, ist die Tertiärstruktur die gleiche und somit bleibt auch die Funktion gleich. Dies lässt sich bei dem Vergleich des Ocytocins verschiedener Wirbel-tiere feststellen.

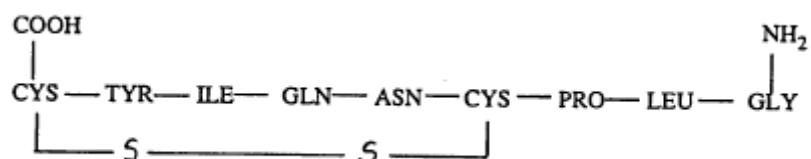
Fische



Amphibien



Säugetiere



V ZUBEHÖR

- Dünnschichtchromatographie von Eiweißen (Aminosäuren) 2: Vasopressin ([201.3276](#))
- Bögen für die DC [10x10] ([200.7895](#))
- Nachweis-Set für Aminosäuren ([201.3277](#))