

Hilfsmittel: Blatt mit den Strukturformeln aller proteinogenen AS (außer bei den Aufgaben, bei denen die Strukturformel einer AS anhand des Trivialnamens selber (auswendig) notiert werden soll).

Aminosäuren

1.1 Glycin besitzt den isoelektrischen Punkt von IEP = 5,97.

- Geben Sie die Strukturformel von Glycin in der ungeladenen, neutralen Form an.
- Erklären Sie den Begriff IEP und geben Sie die entsprechende Zwitterionen-Form an.
- Warum ist Glycin ein salzartiger Stoff und besitzt z.B. einen entsprechend hohen Schmelzpunkt ?

1.2 Geben Sie die Strukturformel von Alanin (IEP = 6,1) an, in der es in der entsprechenden Lösung mit angegebenen pH-Wert überwiegend vorliegt. Alanin: $\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_3$

a) pH = 2

b) pH = 5

c) pH = 6,1

d) pH = 10

1.3 Phenylalanin ($\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$, IEP = 5,5) löst sich immerhin mäßig gut in Wasser (ca. 17 g/L). Erklären Sie diese mäßige Löslichkeit.

1.4 Wie sind die hohen Schmelzpunkte der Aminosäuren zu erklären bzw. die Zersetzung unterhalb der Schmelztemperatur?

1.5 Um beispielsweise Alanin zu synthetisieren, kann man Propansäure mit Brom in Gegenwart von Phosphortribromid als Katalysator umsetzen, wobei am α -C-Atom die Substitution erfolgt. Lässt man die gebildete α -Brompropansäure einige Tage in konzentrierter Ammoniaklösung stehen, so bildet sich Alanin. Formulieren Sie beide Reaktionsgleichungen.

1.6 Geben Sie die Strukturformel (bei pH = 9,0) und den Trivialnamen von *2-Amino-3-methyl-butansäure* an.

1.7a) **[ohne AS-Tabelle als Hilfsmittel]:** Unterstreichen Sie in folgender Tabelle die ca. zwanzig proteinogenen Standardamino-säuren: Alanin, Alanin, Allantoin, Arginin, Arginin, Argininsäure, Asparagin, Asparaginsäure, Axiosin, Berlin, Carotin, Chymotrypsin, Citrullin, Cystein, Cystin, Cytosin, Dauderin, Ethin, Funghin, Giberellin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycerin, Glycin, Histamin, Histidin, Histin, Isoleucin, Jasmin, Kamin, Leucin, Lignin, Lysin, Martin, Methionin, Methylamin, Nuclein, Palmitinsäure, Phenylalanin, Prolactin, Prolin, Saccharin, Sarin, Serin, Serotonin, Thomasin, Threonin, Trypsin, Tryptophan, Tyrosin, Valin, Valproin

b) **[ohne AS-Tabelle als Hilfsmittel]:** Geben Sie namentlich mindestens zwei AS an, für die jeweils gilt: I) aromatisch, II) schwefelhaltig, III) saurer Seitenrest, III) basischer Seitenrest

c) **[ohne AS-Tabelle als Hilfsmittel]:** Geben Sie Namen und Strukturformeln von drei proteinogenen AS an.

Proteine und Peptide

2.1 Wie viele Möglichkeiten der Verknüpfung (**Konstitutionen**) gibt es bei einem Tripeptid, das aus den Aminosäuren Gly, Ala und Val besteht?

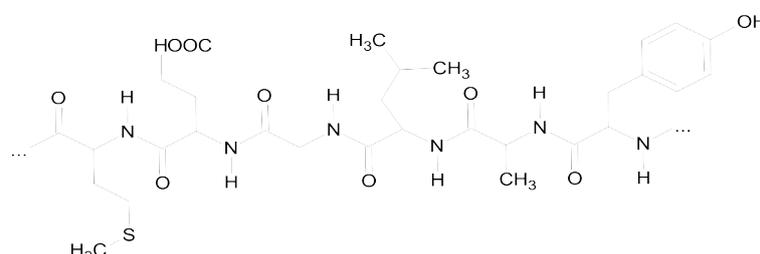
2.2 a) Zeichnen Sie die Strukturformel eines Tetrapeptids mit der Formel (N-terminal) Ala-Glu-Ala-Gly (C-terminal).

b) Kann das Tetrapeptid bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ fotometrisch quantifiziert werden?

2.3 Erklären Sie den Unterschied zwischen Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins.

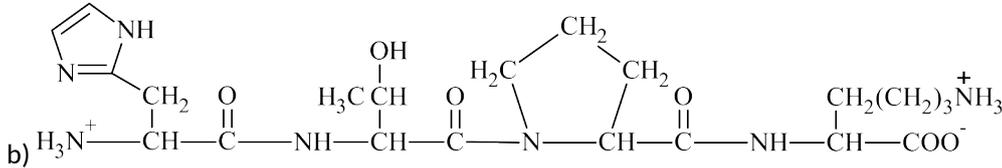
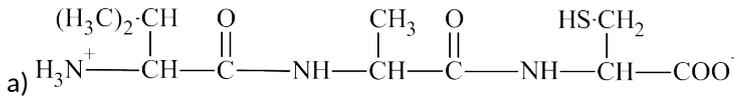
2.4 Welche Faktoren können zu einer irreversiblen Denaturierung des Proteins führen?

2.5 Folgende Skizze zeigt einen Ausschnitt aus einem größeren Molekül:



Begründen Sie, wo das N-terminale und das C-terminale Ende liegt. Geben Sie mit Hilfe der *Tabelle mit den Strukturformeln der Aminosäuren* die Kurzschreibweise des Molekülausschnitts (mit 3-Buchstaben-Codes) an.

2.6 Bestimmen Sie, ob es sich um ein Dipeptid, ein Tripeptid, Tetrapeptid etc. handelt. Geben Sie mit Hilfe der *Tabelle mit den Strukturformeln der Aminosäuren* die Kurzschreibweise der Moleküle (mit 3-Buchstaben-Codes) an.



2.7 Erklären Sie am Bsp. von Prionen den Begriff „Autokatalyse“.

2.8 Wie lässt sich die Zusammensetzung eines Proteins mit einfachen Mitteln bestimmen?

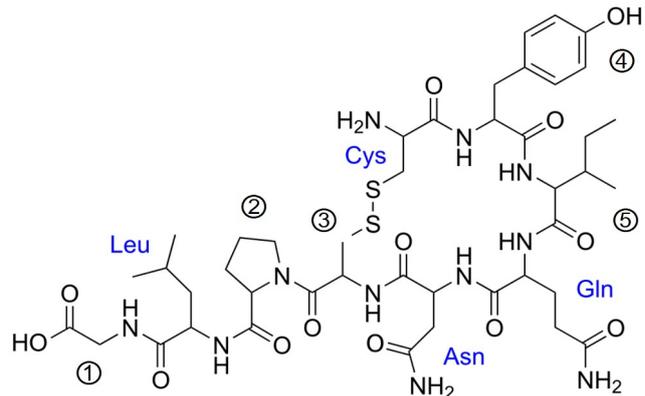
2.9 Beschreiben Sie das Prinzip zur Ermittlung der Primärstruktur eines Proteins.

2.10 Erklären sie , wie sich der Gehalt an Protein in einer Proteinlösung direkt quantifizieren lässt. Weshalb ist die Bestimmung relativ ungenau?

2.11 a) Aus einer wässrigen Lösung soll ein Protein schonend gefällt werden. Nennen Sie 2 Methoden. Was ist mit dem Begriff „schonend“ gemeint? Erklären Sie kurz auf molekularer Ebene.

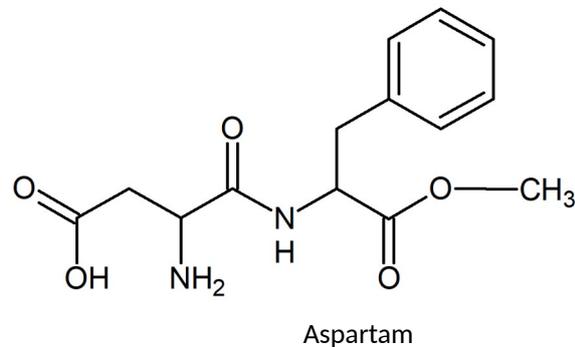
b) Oxytozin ist ein cyclisches Peptid aus 9 Aminosäuren.

Markieren Sie mit Strichen die Grenzen zwischen den einzelnen Aminosäuren. Um welche Aminosäuren handelt es sich bei 1 – 5? [Hinweis: Die OH-Gruppe ganz links, wird beim physiologisch aktiven Oxytocin gegen eine NH₂-Gruppe ersetzt.]



2.12 Aspartam ist ein synthetischer Süßstoff der häufig in Lebensmitteln benutzt wird.

Unter dem Einfluss der Magensäure wird Aspartam bei oraler Einnahme hydrolytisch in drei Verbindungen gespalten, eine davon ist Methanol. Geben Sie die Reaktionsgleichung der vollständigen Hydrolyse an und benennen Sie die neben Methanol entstehenden Produkte.



3. Weitere unsortierte Aufgaben und Aufgaben zu Proteinbestimmungsmethoden

3.1 Der Proteingehalt in einem Zellextrakt wurde mit „w(Protein) = 2,3 % BSA-Äquivalente“ angegeben.

- a) Was ist mit der Angabe „BSA-Äquivalente“ gemeint?
- b) Wie viel Gramm Protein muss zu 600 g des Extraktes gegeben werden, um eine Lösung mit w(Protein) = 10 % zu erhalten?

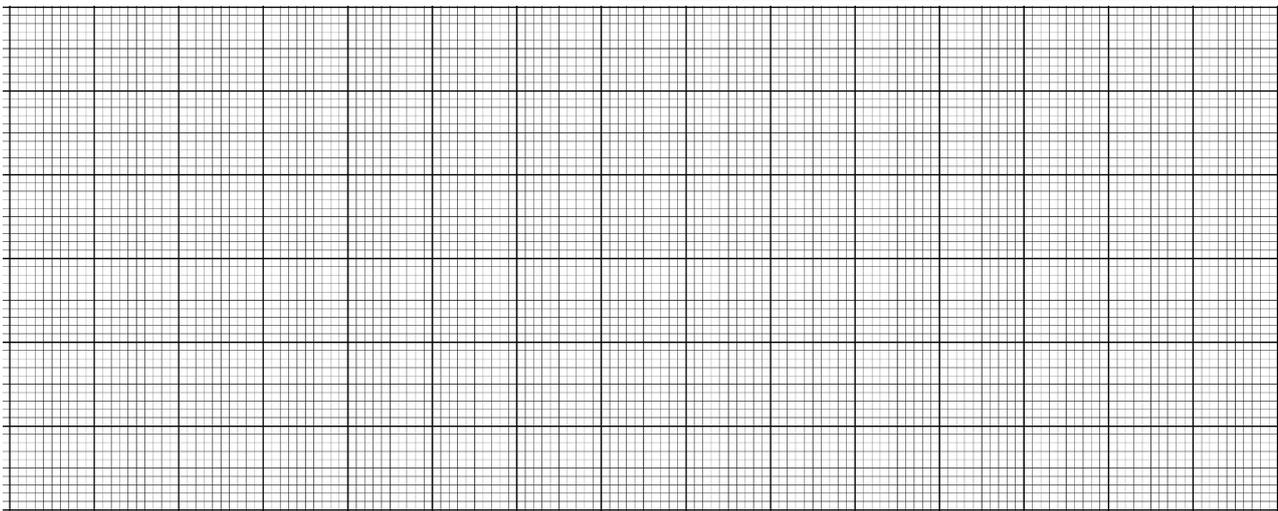
3.2 Der Gesamtproteingehalt eines Zellextraktes wurde mit der LOWRY-Methode bestimmt.

a) Füllen Sie unten stehende Tabelle aus und bestimmen Sie anhand der gegebenen Daten den ungefähren Proteingehalt in der Probe graphisch. HINWEIS Zur Abkürzung: Kalibriergeradengleichungen

- x-Achse: m(BSA) in Mikrogramm: $y = 0,0002099788 * x + 0,0004792671$.
- x-Achse: β (BSA) in mg/mL: $y = 1,0498939248 * x + 0,0004792671$
- x-Achse: V(BSA-Stamm) in mL: $y = 0,209978785 * x + 0,0004792671$

Gehalt der BSA-Stammösung: β (BSA) = 1 mg/mL

BSA-Stamm (mL)	H ₂ O (mL)	β (BSA) (mg/mL)	m(BSA) (μ g)	Proteinlsg. [mL]	Alk. CuSO ₄ -Lsg. [mL]	LOWRY Reagenz [mL]	Absorbanz bei 660 nm
0,25	4,75			0,2	2	0,2	0,052
0,5	4,5			0,2	2	0,2	0,102
1	4			0,2	2	0,2	0,215
2	3			0,2	2	0,2	0,420
3	2			0,2	2	0,2	0,636
4	1			0,2	2	0,2	0,835
5	0			0,2	2	0,2	1,051
0,25 mL der Proteinprobelösung wurden auf ein Gesamtvolumen von 5,0 mL verdünnt.				0,2	2	0,2	0,564

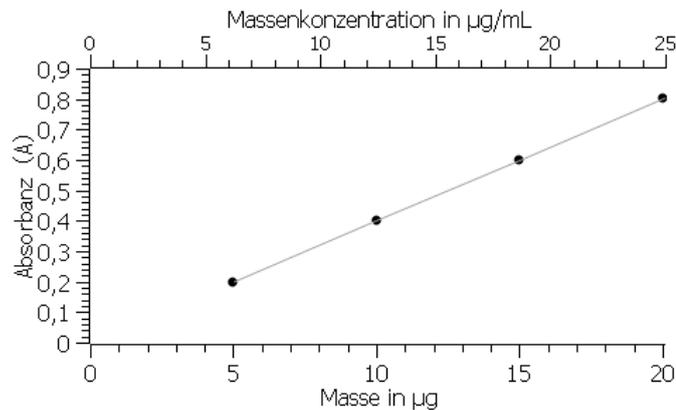


b) Zeigen Sie, dass jede Kalibriergeradengleichung von a) zum selben Endergebnis führt.

3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Eine BSA-Stammlösung besitzt einen Gehalt von $\beta = 1500$ mg/L. Es sollen daraus 4 Kalibrierlösungen hergestellt werden, die zusammen mit dem Blindwert (0 μ g/mL) den Gehalt zwischen 0 μ g/mL und 25 μ g/mL gleichmäßig abdecken. Von jeder Kalibrierlösung sollen **25 mL** hergestellt werden.

- Geben Sie die Konzentration der Kalibrierlösungen an und beschreiben Sie, wie sie hergestellt werden.
- 800 μ L jeder der Kalibrierlösung wurden mit 200 μ L Bradford-Reagenz gemischt. Es ergab sich folgendes Schaubild.



- Erklären Sie, welche zwei Größen auf der x-Achse aufgetragen sind.
 - Der Auszubildende XY gibt auf der x-Achse 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL und 20 µg/mL an. Ist diese Angabe falsch? Begründen Sie.
- c) Die Geradengleichung bei Auftragung der Absorbanz gegen die BSA-Masse (in µg) lautet: $y = 0,0403 \cdot x - 0,0018$. Die Geradengleichung bei Auftragung der Absorbanz gegen die BSA-Konzentration (in µg/mL) lautet: $y = 0,0322 \cdot x - 0,0018$. Verdünnt man 5 mL einer Probe auf 100 mL, entnimmt davon dann 800 µL und gibt 200 µL Bradford-Reagenz dazu, so beträgt die Absorbanz $A = 0,684$. Berechnen Sie die Masse an BSA in der gesamten 5 mL Probe. Zeigen Sie, dass mit beiden Geradengleichungen dasselbe Endergebnis resultiert.
- d) Der Auszubildende XY aus Teilaufgabe b) (siehe dort) erhält ebenfalls die Geradengleichung $y = 0,0403 \cdot x - 0,0018$. Wie muss er weiter rechnen, um zum korrekten Ergebnis zu gelangen?

3.4 Proteinbestimmung (allgemein)

LOWRY beschrieb in den fünfziger Jahren in einem wissenschaftlichen Artikel eine Methode der Proteinbestimmung (Proteinbestimmung nach LOWRY). Die original-Publikation ist der am häufigsten zitierte wissenschaftliche Artikel überhaupt (über alle Disziplinen!)

- a) Worauf beruht die Bestimmung und welches Reagenz wird benutzt?
- b) Nennen Sie einen gravierenden Nachteil der direkten fotometrischen Bestimmung (UV-Test) von Proteinen.
- c) Eine BSA-Standardlösung mit $\beta = 1,74$ g/L besitzt beim UV-Schnelltest eine Absorbanz von $A = 1,182$.
- Wie können daraus 100 mL einer Verdünnung hergestellt werden, die eine Absorbanz von $A \approx 1,0$ besitzen?
 - Die Proteine aus 5,08 g Maismehl wurden extrahiert und auf 100 mL Lösung gebracht. Entnimmt man 10 mL dieser Lösung und verdünnt sie auf insgesamt 50 mL, so resultiert ein eine Absorbanz von $A = 0,479$. Berechnen Sie den Protein-Massenanteil im Maismehl.

Antworten unter www.laborberufe.de

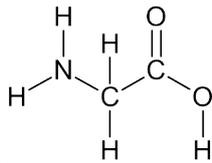
Lösungen - ohne Gewähr

Wenn Ihnen Fehler in den Musterlösungen auffallen, machen Sie mich bitte darauf aufmerksam (info@laborberufe.de). Letztendlich profitieren auch andere Schüler davon.

Aus didaktischen Gründen variiert die Ausführlichkeit der Aufgabenlösungen. So sind manche Lösungen ausführlicher als laut Aufgabenstellung erwartet, bei anderen Aufgaben sind jedoch nur Lösungshinweise gegeben, um den Leser zum eigenständigen Denken anzuregen.

Statt ausführlichen Strukturformeln mit freien e⁻-Paaren sind häufig nur Halbstrukturformeln wiedergegeben.

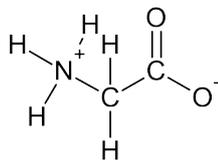
1.1



1a)

b) Der IEP ist der pH-Wert an dem die Aminosäure nach außen hin ungeladen auftritt. Innerhalb des Moleküls liegen die Moleküle allerdings als Zwitterionen vor.

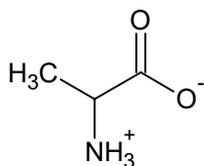
Zwitterionen-Form:



c) Wie alle anderen proteinaufbauende α -Aminosäuren auch, so liegt Glycin als salzartiger weißer Feststoff vor. Grund: Zwischen den Molekülen, die auch im Feststoff als Zwitterionen vorliegen, herrschen ionische Kräfte. Die Moleküle ordnen sich im Kristall so an, dass NH₃⁺-Gruppe und COO⁻-Gruppe jeweils nahe aneinander liegen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Teilchen bedingen den hohen Schmelzpunkt.

1.2

Zwitterionen-Form des Alanin:

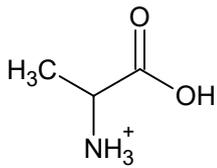


Im pH-Bereich der saurer als der IEP ist, wird die Carboxylatgruppe zur Carboxylgruppe protoniert: $R\text{-COO}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons R\text{-COOH}$. Wegen der positiven Ladung im Rest R (Ammoniumgruppe) entsteht ein insgesamt positiv geladenes Molekül.

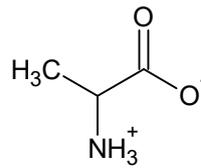
Am pH der dem IEP entspricht, liegt Alanin als Zwitterion vor.

Im Bereich der alkalischer ist als der IEP, wird die Ammoniumgruppe NH₃⁺ deprotoniert: $\text{H}_3^+\text{N-R} + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{N-R} + \text{H}_2\text{O}$. Wegen der negativen Ladung im Rest R (Carboxylatgruppe) entsteht ein insgesamt negativ geladenes Molekül.

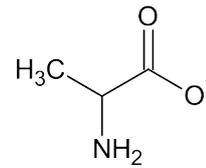
a) pH = 2 und b) pH = 5



c) pH = 6,1



d) pH = 10



1.3

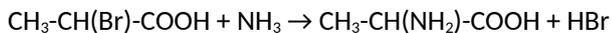
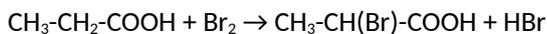
Obwohl die unpolare Bereiche im Molekül überwiegen, löst sich Phenylalanin zumindest mäßig in H₂O (Löslichkeit: ca. 17 g/L). Sowohl die Carboxylatgruppe (COO⁻) als auch die Ammoniumgruppe (-NH₃⁺) können mit H₂O H-Brücken ausbilden. Für die gute Löslichkeit spricht auch der geladene Charakter dieser beiden Gruppen, an denen sich große Hydrathüllen auszubilden können.

1.4

Auch im Reinstoff (Feststoff), liegen die Aminosäuren als Zwitterionen vor. Das verleiht den Feststoffen einen salzartigen Charakter. Die Moleküle werden im Feststoff über elektrostatische Wechselwirkungen (ionische Wechselwirkungen) zusammen gehalten und bauen wie bei allen Salzen ein dreidimensionale Ionenpackung auf. Die Moleküle ordnen sich im Kristall so an, dass NH₃⁺-Gruppe und COO⁻-Gruppe jeweils nahe aneinander liegen. Wie alle Salze, so besitzen auch Aminosäuren hohe Schmelzpunkte. Der Siedepunkt der Verbindungen liegt so hoch, dass er beim Erhitzen nicht erreicht werden kann, da es vorher zur chemischen Zersetzung der organischen Moleküle kommt.

1.5

Hier in Halbstrukturformeln:



1.6

fehlt noch

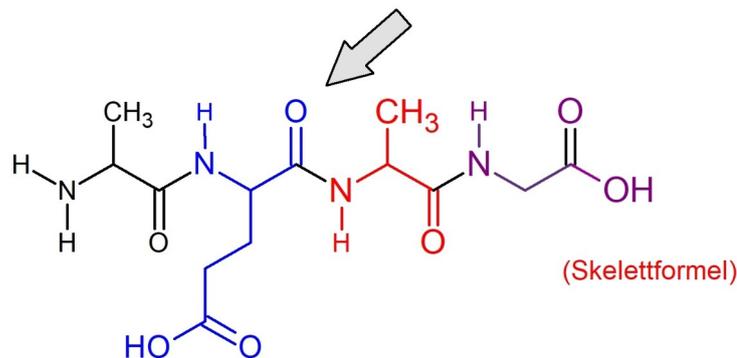
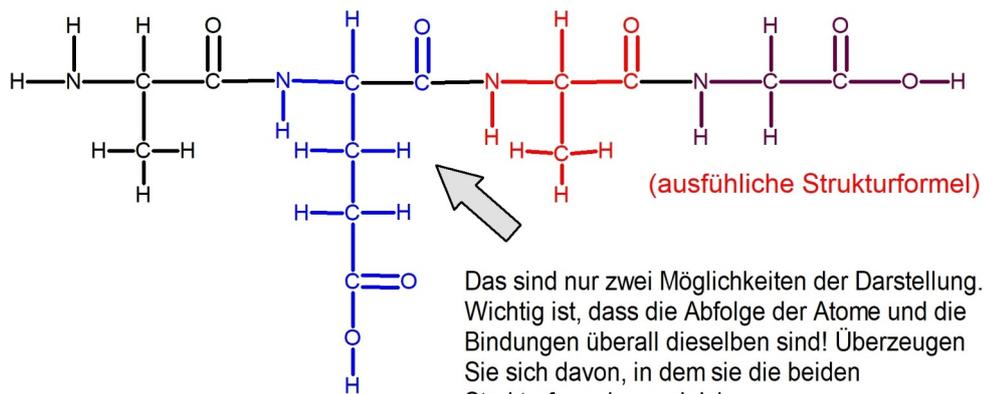
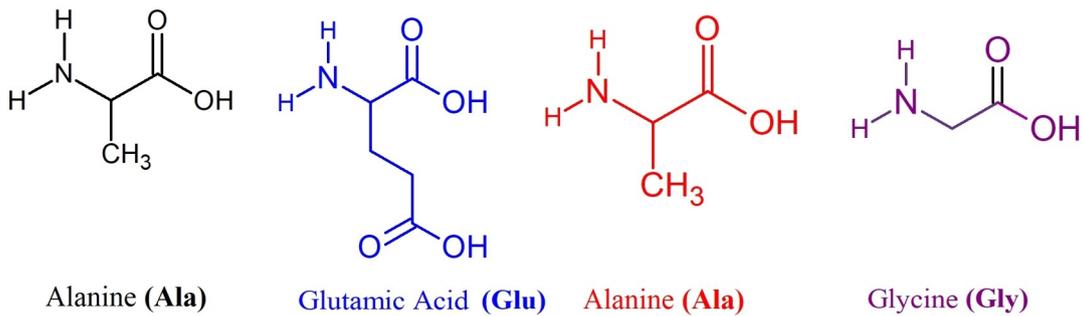
1.7

selbst in Tabelle nachschauen

2.1

Die **Konstitution** eines Moleküls bezeichnet die Art der Verknüpfung der Atome untereinander. Isomere wie Butan und 2-Methylpropan besitzen beispielsweise eine unterschiedliche Art der Verknüpfung, also unterschiedliche Konstitutionen. Insgesamt gibt es 6 verschiedene Konstitutionsisomere: Gly-Ala-Val, Gly-Val-Ala, Ala-Val-Gly, Ala-Gly-Val, Val-Gly-Ala, Val-Ala-Gly

Dabei ist zu beachten, dass z.B. Gly-Ala-Val nicht das Gleiche wie Val-Ala-Gly ist. Man kann also nicht das Molekül einfach Drehen. H₂N-R₁-C(O)-NH-R₂-C(O)-NH-R₃-COOH und H₂N-R₃-C(O)-NH-R₂-C(O)-NH-R₁-COOH sind nicht das Gleiche. Genauso wenig wie das Wort „chemie“ das gleiche ist wie „eimehc“



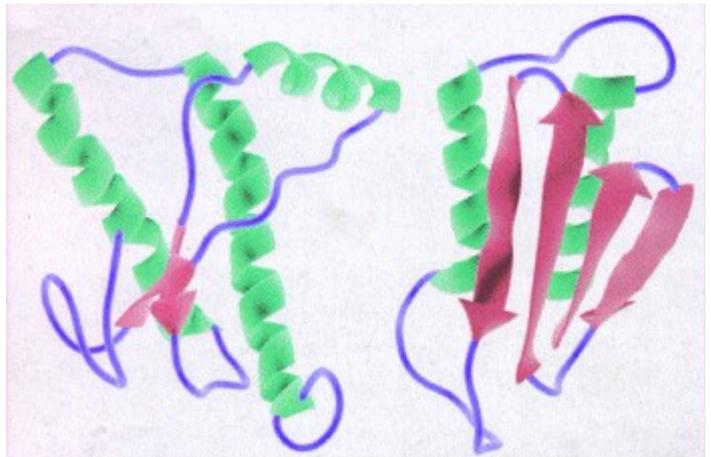
Man beachte folgende Strukturmerkmale: Es treten 3 Peptidgruppen, (-CO-NH-) auf. Es existiert ein carboxyterminales (C-terminales) und ein aminotermiales (N-terminales) Ende

b) Nur aromatische Aminosäuren absorbieren im fotometrisch nutzbaren UV-Bereich (z.B. 280 nm). Da das Peptid keine aromatischen AS enthält, kann es nicht dort quantifiziert werden.

Zuerst mal das Gemeinsame: Sekundärstrukturen sind räumliche Strukturen, genau wie Tertiärstrukturen.

Der Unterschied liegt darin, dass der räumliche Bau der Sekundärstruktur ausschließlich durch H-Brückenbindung zwischen den Peptidgruppen zustande kommt. Tertiärstrukturen basieren andererseits auf bindende Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten. Sekundärstrukturen sind zumindest über kleinere Molekülteile hinweg regelmäßige räumliche Anordnungen, Tertiärstrukturen häufig stark unregelmäßig/knäuelartig. **Die Tertiärstruktur ist die über die Sekundärstruktur hinausgehende räumliche Struktur.**

In der **Abb. rechts** sehen Sie als Beispiels die **Tertiärstrukturen** das „gesunde Prion“ PrP^C und rechts daneben das krankmachende Prion PrP^{Sc}. Die grüne gebänderte Struktur stellen Molekülbereiche mit α -Helix als Sekundärstruktur dar, die Pfeile Molekülbereiche die gegenläufige Faltblattstruktur repräsentieren. Das krankmachende Prion PrP^{Sc} besitzt einen wesentlich höheren Anteil an β -Faltblatt. Eine der Konsequenzen ist, dass dieses Protein schwerer wasserlöslich ist. Es scheidet sich auf den Nervenzellen ab, die deshalb absterben. Das Absterben vieler Nervenzellen erklärt den letalen Verlauf der Creutzfeld-Jacob-Krankheit (beim Mensch), von BSE (beim Rind) und von Scrapie (beim Schaf).



2.4

Die wichtigsten Faktoren sind:

Temperatur: Durch starker Erhitzen werden die Bindungen der AS-Reste untereinander aufgebrochen, s dass die Tertiärstruktur zerstört wird. Es bilden sich andere, neue Bindungen und damit eine neue Tertiärstruktur heraus. Welche das Genau ist hängt auf vom Zufall ab, jede Molekül des Proteins besitzt eine andere neue Struktur, so dass bezüglich der Tertiärstruktur in der Probe „Chaos“ herrscht.

starke Änderung des pH-Wertes: So können durch Protonierung von Carboxylat- und oder Amingruppen in den Resten, Wechselwirkungen aufgehoben und andere neu gebildet werden. Meist wird die Wasserlöslichkeit des Proteins herabgesetzt und das Protein flockt aus einer Lösung als weiße Trübung aus.

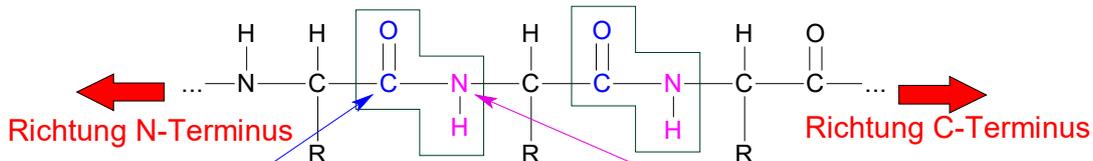
Schwermetalllösungen: Sie zerstören insbesondere die Disulfidbindungen und damit die Tertiärstruktur als ganzes.

2.5

Man beachte die Orientierung der Atome in den Peptidgruppen in der Strukturformel und vergleiche mit den folgenden beiden Strukturen . Die Orientierung der Atome der Peptidgruppen ist wie in der nicht-regelkonformen Darstellung (ganz unten).

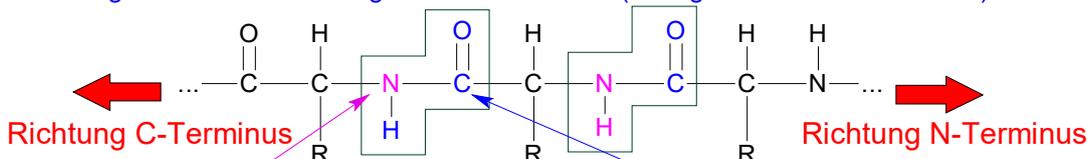


STANDARD-DARSTELLUNG: N-Terminus links



die **Carboxylgruppe** der jeweils linken AS wurde mit der **Aminogruppe** der jeweils rechts stehenden AS verknüpft => an der AS ganz am rechte Ende wird die COOH-Gruppe frei bestehen bleiben => dort ist also der C-Terminus

nicht-regelkonforme Darstellung: N-Terminus rechts! (nicht gemäß den Konventionen)



die **Aminogruppe** der jeweils linken AS wurde mit der **Carboxylgruppe** der jeweils rechts stehenden AS verknüpft => an der AS ganz am rechte Ende wird die NH₂-Gruppe frei bestehen bleiben => dort ist also der N-Terminus

2.6

a) $\text{H}_3\text{N}^+\text{-Val-Ala-Cys-COO}^-$. Es handelt sich um ein Tripeptid

b) $\text{H}_3\text{N}^+\text{-His-Thr-Pro-Lys-COO}^-$. Es handelt sich um ein Tetrapeptid.

2.7

Von einer Autokatalyse spricht man, wenn eine Verbindung ihre eigene Entstehung katalysiert.

Beispiel: $\text{PrP}^{\text{C}} + \text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}} + \text{PrP}^{\text{Sc}}$

Die Reaktionsgeschwindigkeit dieser katalytischen (enzymatischen) Reaktion, steigt exponentiell an. Je mehr Endprodukt (PrP^{Sc}) schon vorliegt, desto schneller bildet sich weiteres Endprodukt.

2.8

Die Proteine können durch saure oder alkalische Hydrolyse in die Aminosäuren gespalten werden. Dazu wird die Proteinlösung mehrere Stunden unter Zugabe von Säuren oder Basen gekocht. Das Reaktionsgemisch (Hydrolysat) kann anschließend chromatographisch aufgetrennt werden. Bei der Dünnschichtchromatographie werden die verschiedenen Aminosäuren durch ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit in der mobilen Phase getrennt. Beendet man die Dünnschichtchromatographie, so sind die verschiedenen Aminosäuren deshalb unterschiedlich hoch gewandert. Durch Vergleich mit der Wanderungshöhe von reinen Aminosäuren, lässt sich schließen, um welche Aminosäure es sich handelt. Eine Identifizierung ist auch über den so genannten R_f -Wert möglich.

2.9

Die Ermittlung der Primärstruktur ist weitaus komplizierter als die Ermittlung der Zusammensetzung. Sie kann durch den Edman-Abbau erfolgen (vgl. Schulbuchseite). Auch können verschiedene Proteinspaltende Enzyme (Proteasen) eingesetzt werden, die an unterschiedlichen Stellen, den Proteinstrang hydrolytisch spalten.

2.10

direkte fotometrische Bestimmung im UV-Bereich. siehe Unterrichtsunterlagen

2.11

a) Aussalzen, Fällung mit Alkoholen. "schonend": weitgehender Erhalt der Tertiärstruktur, d.h. der natürliche räumliche Bau des Proteins

b)

1 Gly

2 Pro

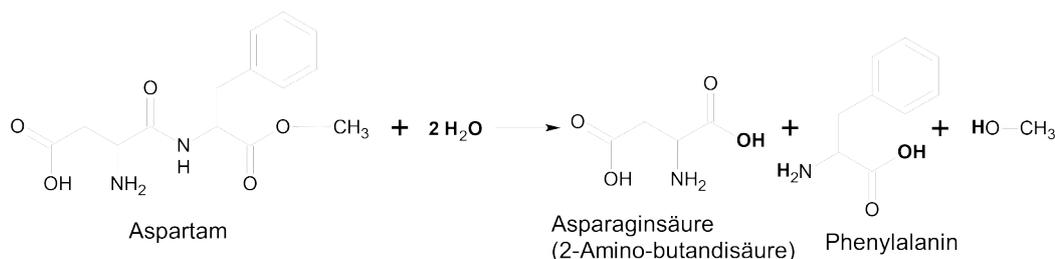
3. Cys

4 Tyr

5 Ile

2.12

Aspartam-haltige *light*-Produkte (z.B. kalorienarme Cola) enthalten häufig einen Warnhinweis: "Enthält eine Phenylalanin-Quelle". Hier wissen Sie jetzt, warum:



3.1

a) Man kann den tatsächlichen Proteingehalt nicht bestimmen, da man die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Proteins nicht kennt. Statt dessen benutzt man BSA als Kalibriersubstanz. Das ist fehlerbehaftet, das Ergebnis entspricht nicht dem tatsächlichen Proteingehalt. Um dies kenntlich zu machen, spricht man von „BSA-Äquivalenten“, d.h. es wird vereinfachend und fälschlicherweise angenommen, dass im Extrakt nur BSA enthalten gewesen ist.

b) Das ist eine einfache Aufgabe, die mit der Mischungsgleichung oder dem Mischungskreuz zu lösen ist.

Endergebnis: Es müssen ca. 51,33 g Protein hinzu gegeben werden.

3.2

Diese Aufgabe haben wir im Unterricht gerechnet. Siehe Unterrichtsunterlagen!

BSA (mL)	H ₂ O (mL)	β(BSA) (mg/mL)	m(BSA) (µg)	Messlsg.	Alk. CuSO ₄ - Lsg.	LOWRY Reagenz [mL]	Absorbanz bei 660 nm
0,25	4,75	0,05	250	0,2	2	0,2	0,052
0,5	4,5	0,1	500	0,2	2	0,2	0,102
1	4	0,2	1000	0,2	2	0,2	0,215
2	3	0,4	2000	0,2	2	0,2	0,420
3	2	0,6	3000	0,2	2	0,2	0,636
4	1	0,8	4000	0,2	2	0,2	0,835
5	0	1,0	5000	0,2	2	0,2	1,051
0,25 mL der Proteinprobelösung wurden auf ein Gesamtvolumen von 5,0 mL verdünnt.				0,2	2	0,2	0,564

3.3

a) **Kalibr_1:** 6,25 µg/mL **Kalibr_2:** 12,5 µg/mL **Kalibr_3:** 18,75 µg/mL **Kalibr_4:** 25 µg/mL

Die Berechnung der herzustellenden Gehalte kann über die Mischungsgleichung erfolgen.

Bsp.-Rechnung für Kalibr_1: $\beta_1 V_1 = \beta_2 V_2 \Rightarrow 1500 \frac{\mu g}{mL} \cdot V_1 = 6,25 \frac{\mu g}{mL} \cdot 25 mL \Rightarrow V_1 \approx 0,1042 mL \approx 104,2 \mu L$

Name und Gehalt	Volumen Stammlsg. in µL	
Kalibr_1 6,25 µg/mL	104,2 µL	ad 25 mL im Messkolben
Kalibr_2 12,5 µg/mL	208,3 µL	
Kalibr_3 18,75 µg/mL	312,5 µL	
Kalibr_4 25 µg/mL	416,7 µL	

b) Statt der Massenkonzentration der Proteinkalibrierlösungen kann man auch die Masse an Protein auftragen die in jeder eingesetzten Proteinlösung (jeweils 800 µL) enthalten ist.

So sind in Kalibr_1 z.B. 0,8 mL · 6,25 µg/mL = 5 µg enthalten. In Kalibr_2 sind es 10 µg, in Kalibr_3 15 µg und in Kalibr_4 20 µg.

Der Auszubildende hat nicht die Massenkonzentration der eingesetzten Proteinlösung als x-Werte gewählt, sondern auch berücksichtigt, dass durch die Zugabe von Bradford-Reagenz die Proteinkonzentration etwas verdünnt wurde.

Verdünnungsfaktor: $800 : 1000 = 0,8$. D.h. Der tatsächliche Proteingehalt unter Berücksichtigung der Verdünnung durch das Bradford-Reagenz beträgt

Kalibr_1: $0,8 \cdot 6,25 \mu\text{g/mL} = 5 \mu\text{g/mL}$. Für die anderen Lösungen folgt in entsprechender Weise: Kalibr_2: $10 \mu\text{g/mL}$, Kalibr_3 : $15 \mu\text{g/mL}$ und Kalibr_4: $20 \mu\text{g/mL}$

Diese Miteinbeziehung des Bradford-Reagenzien ist natürlich zulässig und nicht falsch. Aber sie ist nicht unbedingt sinnvoll, schließlich ist der Verdünnungsfaktor überall gleich und kann deshalb auch weggelassen werden.

c)

Kalibrierung mit Proteinmasse

$$0,684 = 0,0403 \cdot x - 0,0018$$

$$\Rightarrow x = m(\text{Prot}) \approx 17,017 \mu\text{g}$$

Hochrechnung auf die gesamte Proteinlösung:

$$m(\text{Prot}) \approx \frac{100 \text{ mL}}{0,8 \text{ mL}} \cdot 17,017 \mu\text{g} \approx 2127 \mu\text{g}$$

Diese Masse ist in 100 mL Proteinflüssigkeit zu finden. Es ist dieselbe Masse, die sich vor dem Verdünnen in 5 mL der Probelösung befunden hat.

Kalibrierung mit Proteinkonz.

$$0,684 = 0,0322 \cdot x - 0,0018$$

$$\Rightarrow x = \beta(\text{Prot}) = 21,298 \mu\text{g/mL}$$

Insgesamt lagen 100 mL Proteinlösung vor, d.h.

$$m(\text{Prot}) = 100 \text{ mL} \cdot 21,298 \mu\text{g/mL} \approx 2130 \mu\text{g}.$$

[Anm: Die kleine Abweichung im Vgl. zum Ergebnis links ist darauf zurückzuführen, dass bei den Kalibriergeradengleichungen die Steigungen und die y-Achsenabschnitte gerundet wurden].

d) Wie bei c) - *linke Spalte* - erhält der Auszubildende XY die gleiche Zahl, nur mit anderer Einheit:

$$0,684 = 0,0403 \cdot x - 0,0018 \Rightarrow x = \beta(\text{Prot}) \approx 17,017 \mu\text{g/mL}$$

Mit anderen Worten: In 1 mL des Reaktionsgemisches (0,8 mL Proteinlösung + 0,2 mL Reagenz) sind $17,017 \mu\text{g}$ Protein enthalten. Diese Masse ist auch in 0,8 mL der Proteinlösung enthalten. Hochrechnung auf die gesamte Proteinlösung (100 mL):

$$m(\text{Prot}) \approx \frac{100 \text{ mL}}{0,8 \text{ mL}} \cdot 17,017 \mu\text{g} \approx 2127 \mu\text{g}$$

3.4

a) Beruht prinzipiell erst mal auf der Komplexbindung zwischen Peptidgruppen und Cu^{2+} (Biuret-Reaktion). Das durch Reduktion dabei entstehende Cu^+ setzt das Folin-Ciocalteu-Reagenz zu einem blauen Farbstoff um.

b) Nachteil: Die Absorbanz beruht hier auf aromatische AS-Reste. Die sind je nach Protein in unterschiedlichen Anteilen enthalten, so dass sich eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Kalibrierprotein ergibt. Des weiteren stören alle weiteren aromatischen Moleküle (Nucleinsäuren, ATP, Reagenzien und Puffer)

c) I) Die Lösung muss 1,182 mal dünner sein. D.h. Es müssen $100 \text{ mL} : 1,182 \approx 84,6 \text{ mL}$ der Standardlösung mit H_2O auf 100 mL verdünnt werden.

II) Schlussrechnung

$$\beta = 1,74 \text{ g/L} \quad \text{entspricht} \quad A = 1,182$$

$$\beta = ? \quad \text{entspricht} \quad A = 0,479$$

$$\Rightarrow \beta \approx 0,705 \text{ g/L}.$$

In 50 mL sind also $m = 0,03525 \text{ g}$ Protein enthalten. Da 100 mL Extrakt hergestellt wurden, aber nur 10 mL eingesetzt wurden, sind im Gesamtextrakt 10 mal mehr, also $0,3525 \text{ g}$ Protein enthalten.

Der Massenanteil beträgt

$$w = \frac{m(\text{ Protein })}{m(\text{ Maismehl })} = \frac{0,3525\text{g}}{5,08\text{g}} \approx 0,069$$