

Dünnschichtchromatografie (DC1) von Eiweißen



I PRODUKTUMFANG

1. Produktbeschreibung

Dieser Versuch vertieft verschiedene bedeutsame Grundkenntnisse:

- Das Hypophysen-Hormon Oxytocin als ein Nonapeptid (Peptid aus 9 Aminosäuren)
- Bestimmung der Aminosäuren, die das Hormon aufbauen.
-

Selbsttätige Durchführung des Versuchs durch Schüler; Möglichkeit der Einführung in die bidirektionelle Chromatographie.

Wichtige Anmerkung!!!

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; bei der bidirektionellen DC liegt das Hauptaugenmerk auf den Aminosäuren, aus denen das Hormon besteht.

Die Techniken sind nicht sehr verschieden, jedoch sollte vor der Durchführung einer bidirektionellen Chromatographie die unidirektionelle Chromatographie beherrscht sein. Dieses Versuchs-Kit lässt Ihnen die Wahlmöglichkeit zwischen den zwei Methoden.

2. Überprüfung der Hormon-Zusammensetzung

Die Hydrolyse des Hormons ist sehr schwierig, da kovalente, extrem stabile Di-schwefel-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 dieses Problem: Die grundlegenden Aminosäuren, aus denen das

Hormon besteht, werden lösungsbereit geliefert, um sofort eine Chromatographie durchlaufen zu können.

II VORBEREITUNGEN

1. Vorbereitung der Lösung aus dem hydrolysierten Hormon:
Zugabe von 5 ml destilliertem Wasser zur Flasche "Ocytocin".
2. Unidirektionelle DC: Einfüllen des Lösungsmittels
Das Lösungsmittel wird ungefähr 1 cm hoch in die Chromatographiekammer gefüllt. Deckel schließen (die Atmosphäre im Gefäßinneren muss gesättigt sein).
3. Bidirektionelle DC: Vorbereitung des Lösungsmittels für die Chromatographie

A) Erstes Lösungsmittel:
Die Inhalte der 3 Flaschen werden gemischt und ergeben insgesamt 100 ml. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns wird das erste Lösungsmittel ungefähr 1 cm hoch in die Chromatographiekammer gefüllt. Deckel schließen (die Atmosphäre im Gefäßinneren muss gesättigt sein).

B) Zweites Lösungsmittel
Der 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. Das Reagenzmittel wird in eine Sprühflasche umgefüllt.
5. Vorbereiten der DC-Platten: Die Platten in je 4 Teile (10x10 cm) schneiden. Dehydratisieren (= aktivieren) der Platten im Ofen oder Brutschrank (100°C, 20-30 min).

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:

- Lösungsmittel für die Eiweiße (100 ml)

für die bidirektionelle DC:

- 2 Lösungsmittel (je 100 ml)

III. V E R S U C H

1. Versuchsprinzip

Eine Dünnschichtchromatographie wird auf Silicagel-Platten durchgeführt. Dieses Gel ermöglicht die Migration der Lösungen, wobei die Silika-Kügelchen die Funktion eines Molekularsiebs übernehmen. Zusammen mit einem Lösungsmittel führt es zur Trennung der Moleküle nach verschiedenen 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 der ersten Migration wird die Platte um 90° gedreht und eine weitere Migration mit einem anderen Lösungsmittel durchgeführt.

Anleitung für die unidirektionelle DC:

- Eine DC-Platte (5x5 cm) wird im Ofen (20-30 min, 100°C) reaktiviert.
- Befüllung einer Mikrokapillare mit der Hydrolysat-Lösung.
- Aufeinanderfolgende Aufbringung von 2 oder 3 Depots auf dem gleichen Punkt der DC-Platte („Startlinie“).
- Gleichermaßen mit den Vergleichs-Aminosäuren vorgehen. Jede Schülergruppe kann unterschiedliche Lösungen erhalten.
- Einbringung der Platte in die DC-Kammer, die das Lösungsmittel für die Eiweiße enthält. (Das Lösungsmittel darf die Depots nicht erreichen.)
- Migration: ca. 30 min

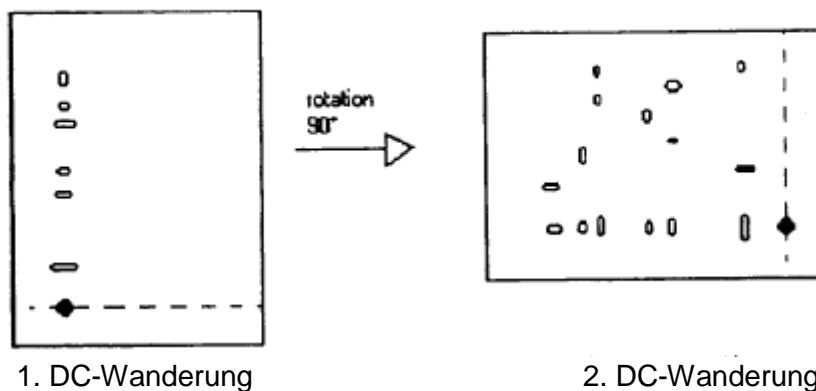
Anleitung für die bidirektionelle DC:

a) erste DC-Auftrennung

Das Verfahren entspricht der unidirektionellen DC. Das Lösungsmittel wird jedoch durch das Lösungsmittel Nr. 1 ersetzt. Des Weiteren wird nur ein Ocytocin-Depot aufgetragen. Die Vergleichs-Aminosäuren werden nicht eingebracht. Nach 2-3 Stunden erfolgt die Entnahme der Platte. Bei Zimmertemperatur trocknen lassen (Erwärmung bewirkt die Verflüchtigung bestimmter Aminosäuren). Die Lösemittelfront kann Verunreinigungen aufweisen (gelb-orange); diese Bande kann abgeschnitten werden.

b) zweite DC-Auftrennung

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



Parallel zu der zweiten DC wird eine Wanderung der Vergleichs-Aminosäuren auf einer anderen Platte durchgeführt (Vorbereitung gemäß Angaben in III 2). Die DC der Vergleichs-Proben wird ebenfalls mit dem 2. Lösungsmittel durchgeführt.

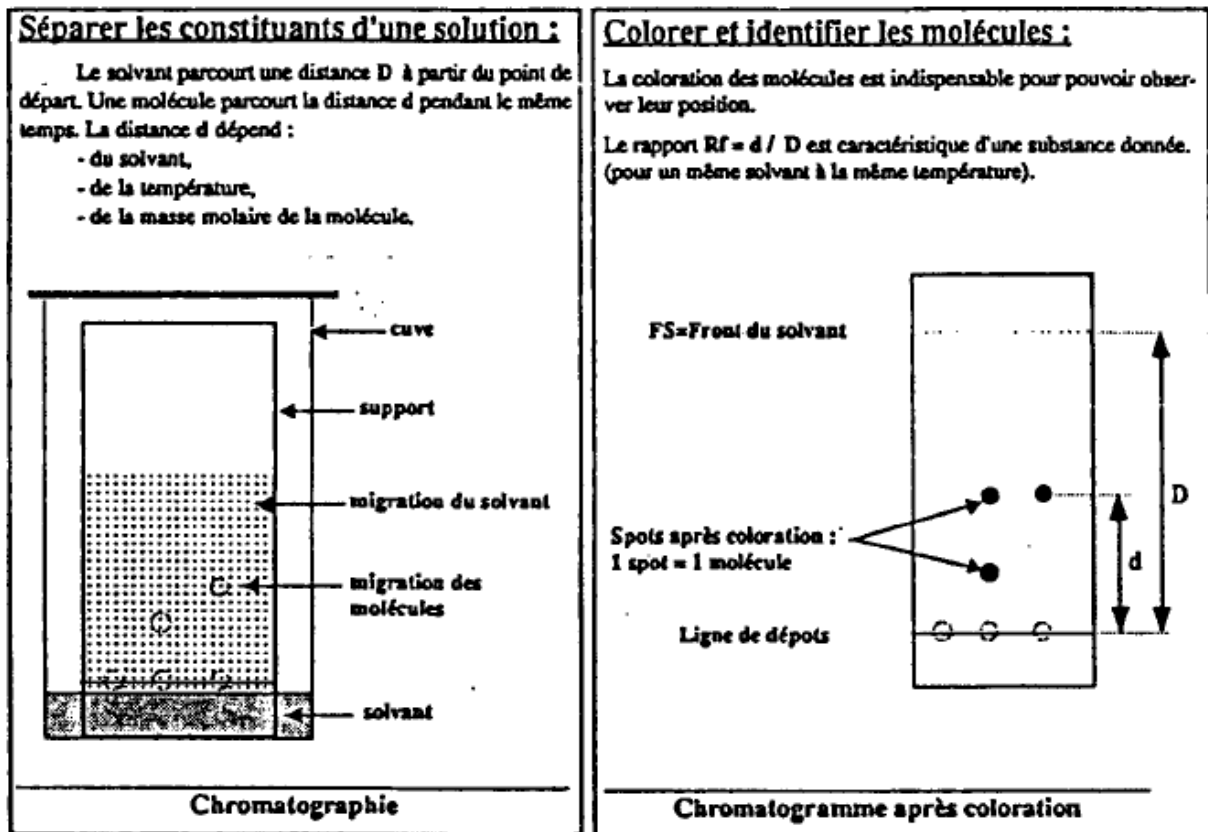
Der Vergleich der DC-Auftrennung der Aminosäuren von Ocytocin (auf einer Platte) und der Vergleichs-Aminosäuren (auf einer oder mehreren anderen Platten) ermöglicht es, die Aminosäuren zu bestimmen, aus denen das Hormon aufgebaut ist. Dies gilt jedoch nur für Versuchsdurchführungen, die am gleichen Tag und auf den gleichen Platten durchgeführt werden.

Chromatographie

Trennen der Bestandteile einer Lösung; das Lösungsmittel 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

Kammer
Trägerschicht
Migration des Lösungsmittels
Migration der Moleküle
Lösungsmittel



Abbildung

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

Depot-Linie („Startlinie“)

2. Entwicklung des Chromatogramms:

Versprühen des ausgewählten Färbemittels/ Entwicklers über der Platte (Chromatogramm).

Markieren der sichtbar gewordenen Flecken, da einige schnell verschwinden.

Ca. 5 min in den Ofen stellen (15 min bei einer bidirektionellen DC).

Die Flecken repräsentieren die unterschiedlichen getrennten Substanzen.

3. Auswertung der Ergebnisse: Identifikation der Substanzen

Vergleich der Wanderungsstrecken 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

| Molécules | |
|---------------------|---------------------|
| 1. Tyrosine | 8. Glycine |
| 2. Lysine | 9. Acide glutamique |
| 3. Cystéine | 10. Alanine |
| 4. Arginine | 11. Isoleucine |
| 5. Acide aspartique | 12. Leucine |
| 6. Glutamine | 13. Phénylalanine |
| 7. Proline | |

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

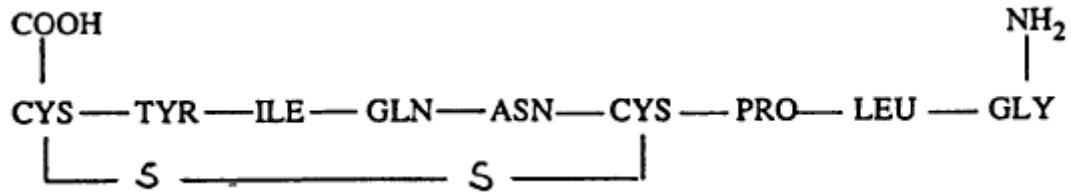
IV. Kommentar:

Ein Vergleich der Polypeptid-Strukturen der Hypophysen-Hormone Ocytocin und Vasopressin kann sehr interessant sein.

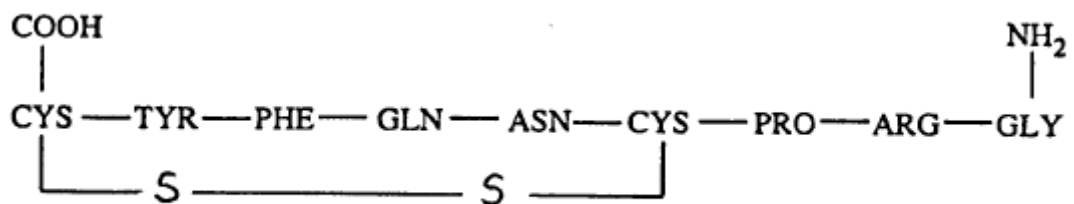
Trotz einer nahezu identischen Polypeptidkette sind die Funktionen der zwei Hormone unterschiedlich. Grund dafür ist die unterschiedliche Anordnung der grundlegenden Aminosäuren: 2 Aminosäuren, die nicht zur gleichen Familie gehören, verursachen eine Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins und somit seiner Funktion.

Dies ist der Fall bei Ocytocin und Vasopressin.

Ocytocin (Säugetier)



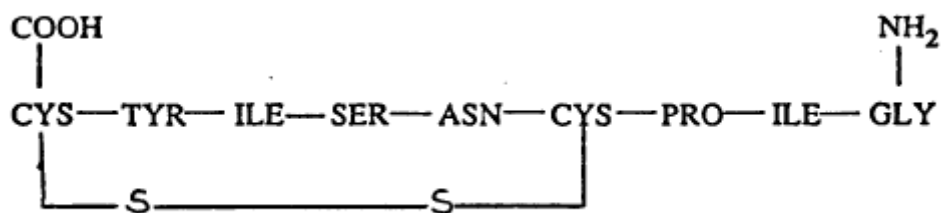
Vasopressin (Säugetier)



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 Wirbeltiere feststellen.

Fische



Amphibien

