

Löslichkeitsverhalten von Proteinen und Proteinbestimmung

Proteine haben eine Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur. Die intakte Sekundär- und Tertiärstruktur ist verantwortlich für das Lösungsverhalten. Aber auch bei intakter Sekundär- und Tertiärstruktur kann das Lösungsverhalten beeinflusst werden, weil es nicht nur vom Protein, sondern natürlich auch vom Lösungsmittel abhängt.

Durch Einwirkung von Hitze und Säure können Proteine irreversibel denaturiert werden. Die Irreversibilität kann dadurch erkannt werden, daß das Protein sich nicht wieder auflöst, wenn man es nach der Hitze- oder Säurebehandlung wieder in die ursprünglichen Bedingungen überführt. Davon unterscheidet sich eine reversible Unlöslichkeit (ohne Denaturierung), die man z. B. durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln oder Salzen erreichen kann. Stellt man die ursprünglichen Bedingungen wieder ein, löst sich das Protein wieder auf (sofern man nicht durch mangelnde Kühlung oder ähnliches unsachgemäßes Verhalten eine unbeabsichtigte Denaturierung erreicht hat). Theoretisch und in einigen Fällen auch praktisch ist es allerdings möglich, eine reversible Denaturierung zu erreichen. Dieses Phänomen wird im Seminar näher erörtert.

Bei Proteinen mit nicht kovalent gebundenen Chromophoren (Coenzymen) ist die intakte Tertiärstruktur Bedingung für die Wechselwirkung zwischen Protein und Chromophor. Bei irreversibler Denaturierung wird der Chromophor freigesetzt. Auch bei der reversiblen Fällung kann die Freisetzung erfolgen, so daß hier die Möglichkeit zur reversiblen Entfernung des Chromophoren besteht. Für Versuche dieser Art eignen sich z.B. Flavin-enzyme, wobei es sowohl Vertreter mit kovalent gebundenen wie nicht kovalent gebundenen Chromophoren gibt.

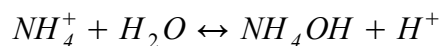
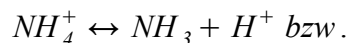
Für die folgende Praktikumsaufgabe benutzen wir mit Puffer verdünntes Eiklar, d. h. ein natürliches Proteingemisch, bei dem allerdings das Protein Ovalbumin (Molekulargewicht 45.000) dominiert.

Aufgaben:

1. Fällung mit Ammoniumsulfat:

Zum Fraktionieren von Proteinen durch "Aussalzen" wird fast ausschließlich Ammonium-sulfat verwendet, weil es eine sehr gute Löslichkeit und eine große Hydratationsfähigkeit hat. Um die wichtigsten Schritte - Herstellen und Verändern von Lösungen benötigter Konzentrationen - zu erleichtern, sind "Nomogramme" ausgearbeitet worden, wie auf einer der folgenden Seiten gezeigt und erläutert. Man kann ablesen, daß zur Herstellung einer gesättigten Lösung bei 0 °C 660 g in einem Liter Wasser zu lösen sind und daß diese Lösung eine Konzentration von 3,7 mol/l hat.

Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ist das Salz einer schwachen Base. Es reagiert deshalb in wäßriger Lösung sauer:



Lösungen müssen deshalb neutralisiert werden, wenn die Empfindlichkeit des zu behandelnden Enzyms das erfordert. Dazu nimmt man Ammoniaklösung. pH-Elektroden sind allerdings für hochkonzentrierte Salzlösungen nicht geeignet, pH-Papier erst recht nicht. Üblich ist, die Ammoniumsulfatlösung vor einer Messung ca. 1 : 10 mit Wasser zu verdünnen. Beim vorliegenden Versuch ist ein Neutralisieren nicht notwendig.

Reagentien und Geräte:

- Verdünnte Eiklarlösung: Zur Bereitung der Proteinlösung wurde das Eiklar eines Hühnereis mit 250 ml 0,05 mol/l "KPO₄"-Puffer pH 7 verdünnt. Die noch trübe Lösung wurde in einer Nutsche mit Papierfilter am Wasserstrahlvakuum filtriert.
- Kühlzentrifuge Beckmann mit zugehörigen Zentrifugenbechern.
- 0,05 mol/l KPO₄ pH 7.
- Ammoniumsulfat, Qualität "für biochemische Zwecke".
- 100 ml Becherglas, 25 ml Erlenmeyerkolben, Magnetrührer, Magnetstift.

Die Zentrifugenbecher müssen mit der Trierwaage austariert werden. Becher mit konzentrierter Ammoniumsulfatlösung dürfen im Rotor nicht wassergefüllten Bechern gegen-übergestellt werden, da sich dann die Schwerpunkte in verschiedener Höhe befinden. Am besten ist es, wenn gleichartige Becher zweier Arbeitsgruppen gegenübergestellt werden.

Ammoniumsulfatlösungen sind korrosiv gegenüber dem Rotormaterial! Verunreinigte Rotoren müssen sofort mit Reinstwasser/Dest-Wasser gespült werden.

Durchführung:

Zunächst wird das Verhalten des Proteins beobachtet, wenn die Ammoniumsulfatkonzentration in der Lösung von 0 mol/l auf 1,5 mol/l erhöht wird. Dazu wird die Hälfte der für 3,0 mol/l benötigten Menge Ammoniumsulfat langsam zum Ansatz gegeben. Danach wird das Protein durch weitere Erhöhung auf 3,0 mol/l Ammoniumsulfat ausgefällt (restliche Zugabe des Ammoniumsulfates). Die für die einzelnen Konzentrationen benötigten Ammonium-sulfatmengen werden mit Hilfe des Nomogramms ermittelt.

15 ml der Proteinlösung werden im Becherglas im Eisbad unter langsamem Rühren auf dem Magnetrührer (zu schnelles Rühren führt zur Schaumbildung; in dem Schaum gebundenes Protein ist besonders denaturierungsempfindlich) innerhalb von ca. 15 min mit gleichmäßigen Portionen Ammoniumsulfat versetzt, und zwar so, daß jede Portion gelöst ist, bevor die nächste zugegeben wird. Dies wird zunächst mit der für eine Zielkonzentration von 1,5 mol/l benötigten Menge Ammoniumsulfat durchgeführt. Nach der letzten Zugabe wird noch ca. 10 Min. gerührt. Zustand der Lösung notieren. Danach wird die zweite, ebenfalls mit Hilfe des Nomogramms ermittelte Ammoniumsulfatmenge auf die gleiche Weise zugegeben. Nach weiteren 10 min Rühren wird mit der Kühlzentrifuge abzentrifugiert (10 min, 15.000 UpM = ca. 36.000 x g). Der Überstand wird abgegossen, der Niederschlag in 2 ml 0.05 mol/l KPO_4 pH 7 gelöst und das Volumen dieser Lösung gemessen.

Diese Lösung, im folgenden "Konzentrat" genannt, die die Hauptmenge des eingesetzten Proteins enthalten sollte, wird in der zweiten Aufgabe (Proteinbestimmung) im Vergleich zur Ausgangslösung analysiert.

Nomogramm für Ammoniumsulfatlösungen bei 0 C. Startkonzentration (initial concentration) und gewünschte Konzentration (Zielkonzentration, desired concentration) werden durch eine Gerade verbunden. Deren Verlängerung gibt auf der Skala rechts außen (Grams to be added to 100 ml of solution) die für 100 ml Ausgangslösung nötige Menge Ammoniumsulfat an. Verbindet man diesen Wert mit dem entsprechenden auf der Skala "gegebenes Volumen" (initial volume) und verlängert diese Gerade nach links, dann liest man auf der Skala "grams required" die für das gegebene Volumen benötigte Ammoniumsulfatmenge ab.

Quelle: F. di Jeso (1968), J. Biol. Chem. 243:2022-2023

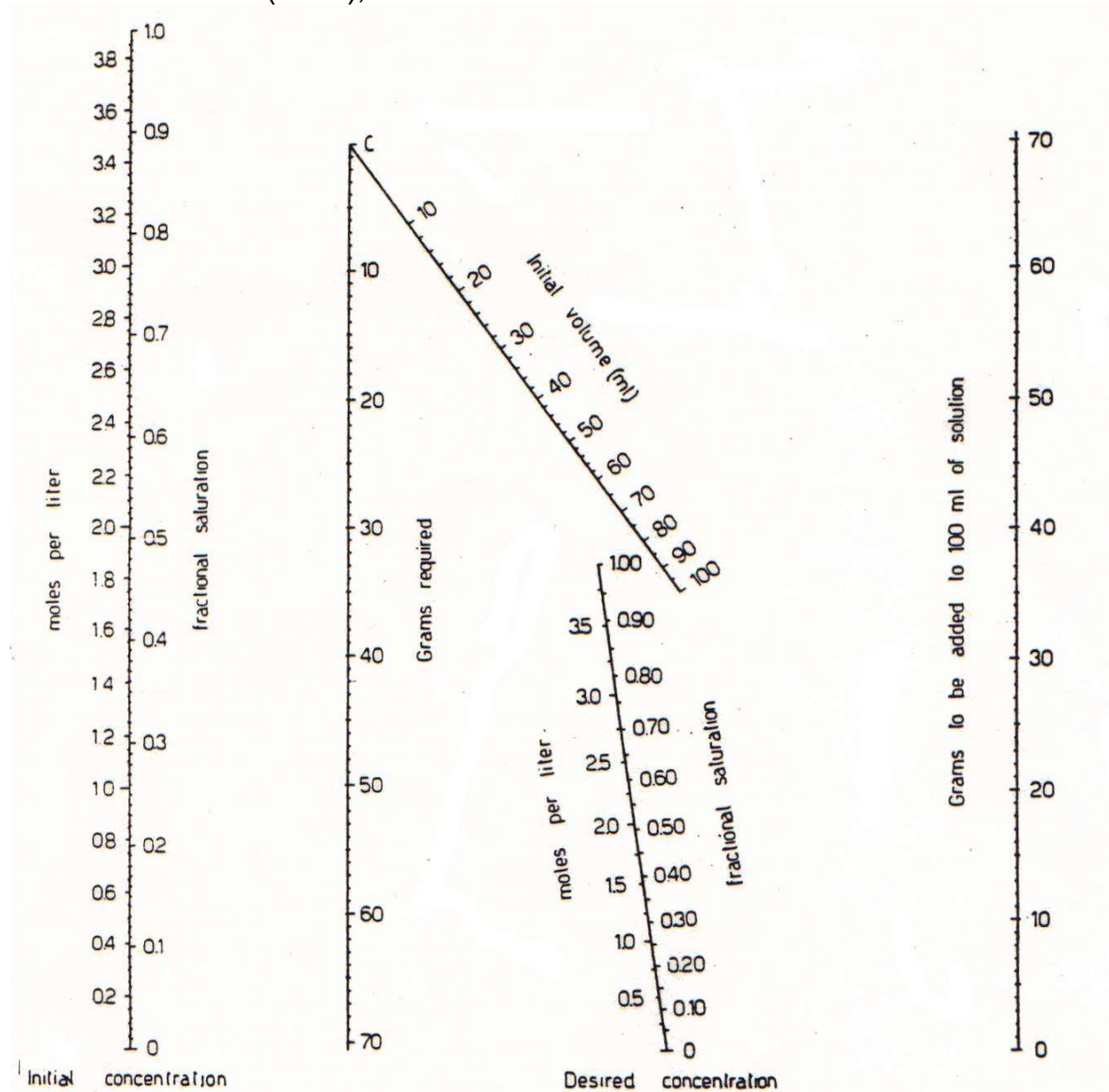


Fig. 1. Ammonium sulfate conversion nomograph for 0°. The given initial concentration and desired concentration are first joined by a straight line. The value from the scale on the extreme right is then read at the point of intersection to give the grams of solid (NH_4SO_4) to be added to 100 ml of the solution. A line from this point through the volume at hand (initial volume) of the solution gives the actual amount of salt required, in grams, read from the grams required line. Over the temperature range -5° to 10° it is recommended that the fractional saturation values be adjusted by adding algebraically 0.002 unit per degree.

2. Proteinbestimmung mit der Biuret-Methode:

Proteine sind chemische Reaktionspartner in einer Fülle von Reaktionen. An den Reaktionen können die vielfältigen funktionellen Gruppen der Seitenketten wie auch das "Rückgrat", d.h. die Peptidbindungen, beteiligt sein. Einige Reaktionen lassen sich für eine quantitative Proteinbestimmung heranziehen.

Die Biuretbestimmung ist in ihrem Prinzip eine Bestimmung der Menge der in einer Probe vorliegenden Peptidbindungen und insoweit unabhängig von der Natur der Aminosäure-seitenketten. In alkalischer Lösung bildet sich ein violetter Kupferkomplex, der photometrisch erfaßt wird. Der Name kommt von der Harnstoff-Kondensationsverbindung Biuret, die wegen der Anwesenheit der CO-NH-Gruppe entsprechend reagiert.

Aufgabenstellung:

Der Proteingehalt der für die Ammoniumsulfatfällung verwendeten Eiklarlösung und der Proteingehalt des wieder gelösten Ammoniumsulfatfällungs-Niederschlags ("Konzentrat") sollen gemessen werden mit dem Ziel, die Ausbeute der Fällung zu berechnen. Eine Eichung der Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe einer Albuminlösung bekannten Gehalts.

Reagentien und Geräte:

Das Biuret-Reagenz wird wie folgt vorbereitet:

8,0 g NaOH lösen in Wasser

9,0 g K-Na-Tartrat lösen in Wasser

3,0 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ lösen in Wasser

5,0 g KJ lösen in Wasser

Alle Komponenten unter Rühren langsam miteinander vereinigen und auf 1 l auffüllen. Das Biuret-Reagenz ist in einer braunen Flasche aufzubewahren (wird zur Verfügung gestellt).

Protein-Standardlösung: 5,00 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA = **b**ovine **s**erum **a**lbumin) in Phosphatpuffer (wird zur Verfügung gestellt).

Durchführung:

Bei Proben, die außer Protein noch Fremdstoffe, vor allem Metallsalze, enthalten, muß das Protein gegebenenfalls von diesen abgetrennt werden. Dies geschieht durch Ausfällen des Proteins mit 30 %iger Trichloressigsäure und Abzentrifugieren (im vorliegenden Falle mit den bekannt reinen Proteinlösungen ist diese Maßnahme nicht nötig). Dabei muß die Säure langsam eingemischt werden, um eine feinverteilte Fällung zu erzielen. Die Fällung wird nach Zentrifugieren und Abgießen des Überstandes in 1 ml Wasser suspendiert. Man verfährt dann weiter, wie in der folgenden Pipettiertabelle angegeben. Der Niederschlag löst sich in der alkalischen Kupfersulfatlösung.

Wie bei allen derartigen Analysen gehen wir nach einer Pipettiertabelle vor (Angaben in ml):

Glas Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5 mg/ml Albumin	0	0,2	0,4	0,6	-	-	-	-	-	-
Original Eiklarlsg.	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Konzentrat	-	-	-	-	0,05	0,05	0,1	0,1	-	-
H ₂ O	2,5	2,3	2,1	1,9	2,45	2,45	2,4	2,4	2,0	2,0
"Biuret"-Lösung	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
E ₅₄₆										

Nach gutem Durchmischen bleiben die Proben 10 min stehen. Danach wird ihre Extinktion bei 546 nm in der 1-cm-Küvette im Photometer gemessen. Die Daten werden in die Tabelle eingetragen. Der Blindwert "Glas 1" ist von allen übrigen Werten abzuziehen. Die ΔE -Werte werden gegen die ml Albuminlösung in ein Diagramm eingetragen. Wie groß ist das für 1 mg Protein unter Versuchsbedingungen erzielte ΔE_{546} ? Der Wert kann dann der Berechnung der Ansätze 5 bis 10 zugrundegelegt werden.

Protokolle:

Bei der Aufgabe 1 werden die Beobachtungen beschrieben. Dabei bitte Mengen und Konzentrationen in den Text aufnehmen. Bei Versuchsteil 2 kommt die vervollständigte Pipettiertabelle dazu, die Eichkurve, die mit der Albuminlösung erzielt wurde und die explizite Angabe der Proteinausbeute von Aufgabe 1.

Literatur:

Die Lehrbücher von Lehninger, Rawl und Karlson enthalten die notwendigen Informationen. Zur Methode der Proteinbestimmung und der Ammoniumsulfatfällung siehe in der Handbuchreihe "Methods in Enzymology" den Band III sowie das Buch von H. Aebi et al. "Einführung in die praktische Biochemie".