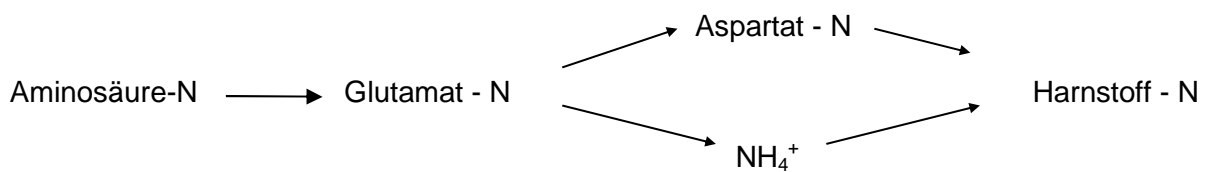


1 PROTEINE

1.1 Bestimmung der Arginaseaktivität in der Leber

Von so genannten ureotelen Lebewesen wird Aminosäurenstickstoff hauptsächlich in Form von Harnstoff ausgeschieden. Die beiden Stickstoffatome des Harnstoffs stammen von zwei Vorläufern ab: dem Ammoniumion und der Aminosäure Asparaginsäure. Der Weg des Aminosäurenstickstoffs geht aus folgendem Schema hervor:



Die Harnstoffsynthese läuft in der Leber ab. Der letzte Schritt der Harnstoffsynthese ist die Arginasereaktion, in deren Verlauf Arginin zu Ornithin und Harnstoff hydrolysiert wird.

Versuchsprinzip:

Arginin wird mit Leberhomogenat (Enzymquelle, Schweineleber v. Schlachthof) inkubiert. Die nach 10 Minuten entstandene Menge an Harnstoff wird mit Hilfe von Urease enzymatisch bestimmt. Urease spaltet Harnstoff hydrolytisch in Ammoniak und Kohlensäure. Die aus Ammoniak entstandenen Ammoniumionen bilden mit Salicylsäure und Natriumhypochlorit einen Farbstoff, dessen Extinktion der Harnstoffkonzentration proportional ist und bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen wird.

Versuchsdurchführung:

Arginasereaktion:

| Probe | 0 | 0' | P1 | P2 |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| HClO ₄ 0,5 mol/l | 0,1 ml | 0,1 ml | — | — |
| Arginin 0,1 mol/l | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| Carbonatpuffer 0,1 mol/l, pH 9,5 | 0,3 ml | 0,3 ml | 0,3 ml | 0,3 ml |
| Homogenat | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |

Der Nullwert und die Probe werden als Doppelbestimmung angesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C im Wasserbad wird die Reaktion mit 0,1 ml HClO₄ (0,5 mol/l) in Probe P1 und P2 abgestoppt.

Probe 0 ist ein Probenblindwert, der später von den Werten der Proben 1 und 2 subtrahiert wird.

Für die Harnstoffbestimmung werden jeweils 0,05 ml aus dem Arginase-Versuchsansatz (Probe 0, 0', P1, P2) verwendet.

Der Standard wird als Doppelwert (Standard1 + Standard2) angesetzt.

Harnstoffbestimmung:

| | Leerwert | Standard1 | Standard2 | 0 | 0' | P1 | P2 |
|-------------------------------|----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|---------|
| Probe | — | — | — | 0,05 ml | 0,05 ml | 0,05 ml | 0,05 ml |
| Standard | — | 0,05 ml | 0,05 ml | — | — | — | — |
| Puffer/Urease Salicylsäure | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |

Ansätze mischen und mindestens 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

Anschließend in jedes Röhrchen 2,5 ml Na-Hypochlorit pipettieren, gut mischen und mindestens 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Innerhalb von 1 h sind die Extinktionen von Standard und Proben gegen den Leerwert zu messen.

Auswertung:

Es wird zunächst die in der Arginase-reaktion entstandene Harnstoffmenge in µmol berechnet. Die Konzentration des Harnstoffstandards beträgt 30 mg/100ml, die Molmasse 60 g/mol.

Davon werden 0,05 ml in die Urease-Reaktion eingesetzt:

0,05 ml Harnstoffstandard = µmol Harnstoff

Die Harnstoffmenge in 0,05 ml **Probe** beträgt dann

$$\text{Harnstoffmenge}_{\text{Probe}} (\mu\text{mol}) = \frac{E_{\text{Pr.}}}{E_{\text{St.}}} \times 0,25 \mu\text{mol}$$

Mittels dieses Wertes lässt sich die Arginaseaktivität in µmol/min = I.E. des Leber-homogenats errechnen.

E_{st} : Extinktion des Harnstoffstandards

E_{Pr} : Extinktion der Probe

1.2 Bestimmung freier Aminosäuren mit Ninhydrin

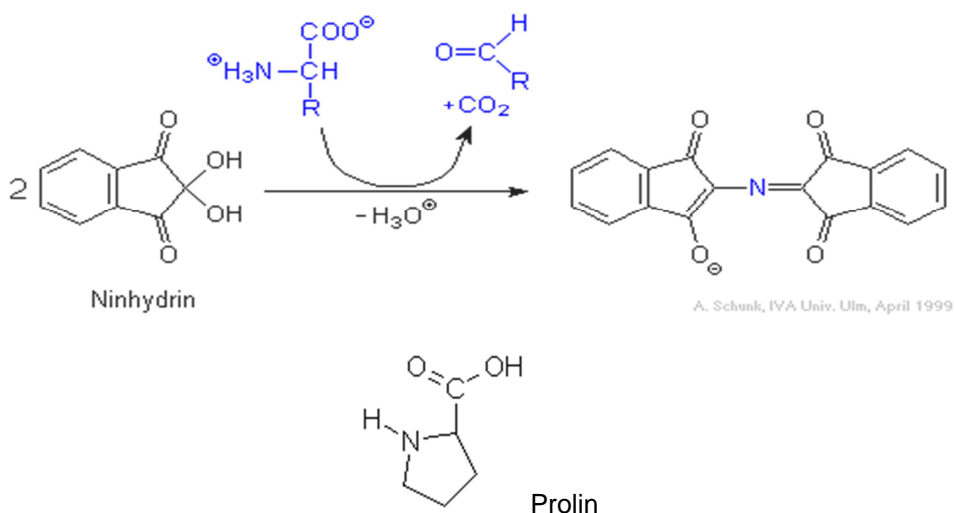
Die Menge der freien Aminosäuren im Blut variiert mit dem zeitlichen Abstand von der Nahrungsaufnahme und dem Proteingehalt der Nahrung. Zu einer starken Erhöhung der Aminosäurekonzentration des Blutes kann es bei einem akuten Leberschaden (reduzierte Desaminierungsrate) kommen. Unter dem Einfluss anaboler Hormone (Wachstumshormon, Insulin) sinkt der Aminosäurespiegel.

Versuchsprinzip:

Die gängigste Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Aminosäuren (z.B. im Blutplasma) ist die Ninhydrinreaktion. Aufgrund ihres gleichartigen Aufbaus lassen sich alle α -Aminocarbonsäuren mittels der Ninhydrinreaktion nachweisen bzw. quantitativ bestimmen.

Für die Pyrrolidincarbonsäure Prolin gilt dies nicht. Ninhydrin reagiert mit den primären Aminogruppen, wobei nach Dimerisierung ein typischer rot-blauvioletter Farbstoff (Ruhemanns Purpur) entsteht.

Die Extinktion dieses Farbstoffes kann bei 570 nm gemessen werden. In der Reaktion wird die Aminosäure decarboxyliert und die Aminogruppe auf Ninhydrin übertragen, wobei aus der Aminosäure ein Aldehyd hervorgeht. Das nun entstandene primäre Amin reagiert dann mit einem weiteren Molekül Ninhydrin, wodurch der Farbstoff Ruhemanns Purpur entsteht. Da Prolin eine sekundäre Aminogruppe enthält (2 Kohlenstoff-Atome an Stickstoff gebunden), kann die Aminogruppe nicht auf Ninhydrin übertragen werden, es entsteht das gelb gefärbte Additionsprodukt aus einem Molekül Ninhydrin und Prolin.



Die Farbreaktion wird häufig zur Visualisierung von Aminosäuren nach chromatographischen oder elektrophoretischen Methoden benutzt. Die Ninhydrin-Reaktion kann aber auch zur Visualisierung von Fingerabdrücken in der Forensik dienen. Der Hautschweiß enthält kleine Mengen freier Aminosäuren, welche mittels Ninhydrin angefärbt werden können. Eine weitere Anwendung ist der Nachweis freier Aminosäuren im Blutplasma. Im Versuch soll die Konzentration einer unbekanntem Aminosäurelösung anhand eines Standards bestimmt

werden. Die unbekannte Aminosäurelösung simuliert dabei ein Blutplasma, das durch die Fällung seiner Proteine zuvor enteiweißt worden ist.

Versuchsdurchführung:

Auf einem Blatt Papier werden Fingerabdrücke genommen. Diese werden mit einer Ninhydrinlösung besprüht und die Flecken bei 60-80°C für ca. 20-30 Minuten entwickelt.

Während der Entwicklungszeit soll der Aminosäuregehalt einer ausgegebenen Probe bestimmt werden. Die Probenbezeichnung lautet im weiteren Text **X**.

Herstellung einer Aminosäure-Eichkurve aus einer Glycin-Stammlösung (3mg/ml):

| | St. 1 | St. 2 | St. 3 | St. 4 | St. 5 |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | ... mg/ml | ... mg/ml | ... mg/ml | ... mg/ml | ... mg/ml |
| Glycin-Stammlösung (3mg/ml) | 100µl | 100 µl | 100 µl | 100µl | 100µl |
| H ₂ O | 500µl | 300µl | 200µl | 140µl | 100µl |

Die Standards sind gut zu mischen, bevor sie in den folgenden Ansatz pipettiert werden.

Welche Konzentrationen ergeben sich für die einzelnen Standards?

Pipettierschema zur Bestimmung von **X**:

| | Leerwert | St. 1 | St. 2 | St. 3 | St. 4 | St. 5 | X |
|------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Puffer | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl | 20µl |
| Standard | - | 25µl | 25µl | 25µl | 25µl | 25µl | - |
| Probenlösung | - | - | - | - | - | - | 25µl |
| Ninhydrin | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl |
| H ₂ O | 25µl | - | - | - | - | - | - |

Die Ansätze sind in Eppendorfgefäße zu pipettieren und gut zu mischen, bevor sie für 10 Minuten bei 37°C inkubiert werden.

In der Zwischenzeit werden für jeden Ansatz (7 Stück) 950µl Ethanol_{abs.} in je ein neues Eppendorfgefäß pipettiert.

Nach der Inkubation sind die Gefäße zum Abkühlen der Lösung **kurz** auf Eis zu stellen.

Jedem Ansatz sind 50 μ l zu entnehmen und in die 950 μ l Ethanol_{abs.} zu pipettieren.

Die Extinktionen werden am Fotometer bei einer Wellenlänge von 570nm ermittelt und die Werte grafisch dargestellt.

Mit Hilfe der Grafik lässt sich die Konzentration der ausgegebenen Probe ermitteln.