

Øvelser om aminosyrer og peptider

Øvelse 3

Bestemmelse af proteinindhold ved Biuretmetoden.

Formål

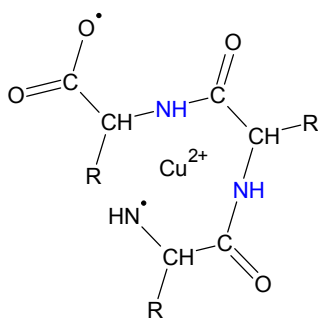
Øvelsens formål er at bestemme proteinindholdet i en ukendt stoffblanding og i skummetmælk spektrofotometrisk med Biuretmetoden. Metoden beror på en kompleksdannelse mellem Cu^{2+} og proteinstoffet.

Kemikalier og apparatur

Biuretreagens (se lærervejledning), 0,1 M NaOH, 0,02 M NaOH (0,1 M fortyndet), 2 stk. 10 mL målekolbe, 7 stk. 25 mL koniske kolber (nummereret I-VII), 8 stk. reagensglas i stativ, 50 mL målekolbe, 2 stk. 10 ml pipetter, automatpipette (5 mL og 1 mL)(Fx CappAero™ Single Pipette 1-5 mL), magnetomrører, sprittusch til at skrive på kolberne, casein, udleveret ukendt stoffblanding, skummetmælk, spektrofotometer.

Teori

Proteiner er som bekendt opbygget af aminosyrer, der er bundet sammen med peptidbindinger, karakteriseret ved gruppen $-\text{NHCO}-$. Biuretreagenset indeholder Cu^{2+} -ioner, som kan danne Cu^{2+} -protein-komplekser med nitrogenatomet fra peptidgrupperne som ligander. Komplekserne har en blåviolet farve og absorberer lys ved ca. 540 nm. Farveintensiteten og hermed absorptionen af lyset er proportional med antallet af peptidbindinger i opløsningen, som er proportional med proteinkoncentrationen.



Modeludsnit af Cu^{2+} -proteinkomplekset
(ca. 4 peptidbinger pr. Cu^{2+} -ion)

I øvelsen fremstilles en standardkurve ud fra kendte proteinkoncentrationer. Herved kan ukendte proteinkoncentrationer bestemmes, idet der benyttes at Lambert-Beers lov gælder for små koncentrationer dvs.: $A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot [\text{protein}]$, hvor A er absorbansen ved den valgte bølgelængde, ε_{λ} er ekstinktionskoefficienten for fastholdt bølgelængde, l er kuvettebredden og $[\text{protein}]$ den aktuelle proteinkoncentration af stoffet.

Forsøgsbeskrivelse

Fremstilling af 4 standardopløsninger til standardkurve:

Der afvejes ca. 100 mg casein nøjagtigt, som overføres til en 10 mL målekolbe og fyldes til mærket med 0,02 M NaOH. Proteinet opløses ved magnetomrøring. Denne opløsning kaldes stamopløsning A og hældes over i en konisk kolbe mærket I. Der afpipetteres 5,00 mL af denne (med automatpipette), som overføres til en konisk kolbe mærket II og der tilsættes yderligere 5,00 mL 0,02 M NaOH ligeledes med automatpipette. Efter blanding afpipetteres 5,00 mL af den fortyndede opløsning i en ny kolbe (III) og tilsættes 5,00 mL 0,02 M NaOH. Dette gentages endnu engang, og man har nu 4 opløsninger med proteinkoncentrationer i området 1,25 - 10 mg protein pr. mL. (se bilag med hjælpeskema).

Fremstilling af 2 analyseopløsninger af den proteinholdige stofblanding:

Ca. 100 mg af den udleverede stofblanding afvejes nøjagtigt og overføres til en 10 mL målekolbe, som fyldes til mærket med 0,02 M NaOH. Stoffet opløses ved at vende kolben mindst 10 gange. Denne opløsning kaldes opløsning B og overføres til en konisk kolbe mærket V. 5,00 mL overføres til en kolbe mærket VI, tilsættes yderligere 5,00 mL 0,02 M NaOH og blandes.

Fremstilling af analyseopløsning med skummetmælk:

Der afpipetteres 10 mL skummetmælk ned i en 50 mL målekolbe. Dernæst tilsættes med pipette 10 mL 0,1 M NaOH, og der fyldes op til mærket med demineraliseret vand. Denne opløsning kaldes opløsning C, og 10 mL heraf overføres til den koniske kolbe mærket VII.

Fremstilling af måleopløsninger:

Til 7 reagensglas (mærket 1-7) sættes 1,00 mL med automatpipette af hver af de 7 koniske kolber mærket I-VII. Til reagensglas nr. 8 sættes 1,00 mL 0,02 M NaOH (blindprøve). Til hvert glas sættes herefter 5,00 mL biuret reagens med automatpipette. Efter grundig blanding og henstand i 30 min. er opløsningerne klar til måling.

Måling med spektrofotometeret

Optagelse af spektrum. Hvis muligt optages et scan-spektrum med absorbansen som funktion af bølgelængden, for at finde ud af hvor Cu^{2+} -proteinkomplekset absorberer maksimalt. Til dette anvendes den mest koncentrerede af de 4 standardopløsninger. (Indholdet gemmes til den kvantitative bestemmelse). Spektret optages i området 700-300 nm (alternativt 800-400 nm).

Kvantitativ bestemmelse: Spektrofotometeret klargøres og indstilles på den korrekte bølgelængde, idet λ_{max} vælges fra det optagne spektrum. Spektrofotometeret nulstilles med blindprøven som reference, og absorptionen af alle opløsningerne måles på sædvanlig vis - resultaterne indføres på resultatarket.

Efterbehandling

- a) Først beregnes hvor mange mg protein der findes i de koniske kolber mærket I-IV. Dernæst findes koncentrationen i mg protein pr. mL opløsning for de 4 måleopløsninger til standardkurven.
- b) Der tegnes en standardkurve med absorptionen som funktion af mg protein pr. mL måleopløsning. Kurven skulle gerne følge Lambert-Beers lov, og det skulle nu være muligt ved hjælp af lommeregnerens faciliteter eller graf-tegningsprogrammets at bestemme forskriften for den bedste rette linie. Dernæst bestemmes koncentrationerne i de målte analyseopløsninger vha. standardkurven. (Benyttes TI-83 kan koncentrationerne af de ukendte analyser let bestemmes vha. SOLVEREN, når forskriften er kendt.)
- c) Ud fra resultaterne, idet der tages hensyn til fortyndingerne, beregnes det procentiske indhold af protein i den udleverede stofblanding. Sammenhold resultatet med lærerens facitliste og kommenter resultatet.
- d) Beregn dernæst proteinindholdet i skummetmælk i antal mg protein pr. 100 mL og sammenlign med deklARATIONEN på mælken.
- e) Udregn hvad koncentrationen af NaOH er i opløsning C. Passer det med det du forventer? Forklar hvorfor?

Bilag til efterbehandling af resultater

Masse af casein afvejet:

Navn på analyse:

Masse af analyse afvejet:

Resultatskema

Nummer på konisk kolbe	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Indhold af protein	Opl. A	5,00 mL I	5,00 mL II	5,00 mL III	Opl. B	5,00 mL V	10,0 mL Op. C	
Indhold af 0,02 M NaOH	0 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	0 mL	5,00 mL	0 mL	
Masse af protein (mg/kolbe)								
Nummer på reagensglas	1	2	3	4	5	6	7	8
Der tilsættes 1,00 mL af det anførte:	I	II	III	IV	V	VI	VII	0,02 M NaOH
Der tilsættes Biuret reagens	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL	5,00 mL
Koncentration af protein: $C(mg/mL)$								
Absorbansen A (målt) af proteinopløsningen.								