

GENAXXON bioscience GmbH, Söflinger Str. 70, DE-89077 Ulm

Vetain GmbH

 Herr Philipp Riedl
 An der Flur 9
 85604 Zorneding

06. Mai 2021

- Ergebnis Aminosäureanalyse / Proteinprobe -

Es wurde 1 Proteinprobe (Pflanzenmehl aus verschiedenen Pflanzen) an Genaxxon geschickt. Es sollte die Gesamtheit an Aminosäuren analysiert werden. Da Methionin und Cystein bei der Totalhydrolyse zerstört werden, wird sowohl eine Totalhydrolyse als auch eine oxidative Hydrolyse durchgeführt. Bei der Oxidation mit Perameisensäure wird Methionin in das hydrolysestabile Methioninsulfat und Cystein in die hydrolysestabile Cysteinsäure überführt.

Tabelle 1: Probenbezeichnung

Probenbezeichnung	Puffer	Entnommene Menge für oxidative Hydrolyse	Entnommene Menge für Standardhydrolyse
Proteinmehlprobe		105804µg	104694µg

Probeneingang: 27.04.2021

Vorgehensweise:

Saure Hydrolyse:

Von der Probe wurde die in Tabelle 1 angegebene Menge, genau, in ein Hydrolyseröhrchen eingewogen, mit 5000µL 6N Salzsäure versetzt, unter Vakuum (<20mbar) verschmolzen und 24h bei 110°C hydrolysiert. Anschließend wurde die Probe bei 36°C für 12h getrocknet (Vakuumzentrifuge)

Die getrocknete Probe wurde in 10mL Probenverdünnungspuffer (Na-Acetattpuffer, pH 2,2) aufgenommen und nach weiteren Verdünnungen der chromatographischen Messung zugeführt.

Oxidation und anschließende saure Hydrolyse:

Es wurden die in Tabelle 1 angegebene Menge, genau, in ein Hydrolyseröhrchen eingewogen, mit 1000µL einer frisch hergestellten Perameisensäure überschichtet und ca. 24h bei 0°C - 5°C oxidiert. Überschüssiges Oxidationsreagenz wurde durch Zugabe von Natriumdisulfit (Spatelspitze) zerstört.

Die oxidierte Probe wurde mit 5000µL 6N Salzsäure versetzt und für 24h bei 110°C offen hydrolysiert (Mikroapparatur mit Rückflußkühler (Luftkühler))

Anschließend wurde die Probe bei 40°C in der SpeedVac 14 h unter Vakuum getrocknet.

Die getrocknete Probe wurden in 10mL Probenverdünnungspuffer (Na-Acetattpuffer, pH 2,2) aufgenommen.

Schwebstoffe wurden abzentrifugiert, und nach ggf. weiteren Verdünnungen der chromatographischen Messung zugeführt.


 Zertifikat-Registrier-Nr.
 12 100 39900 TMS

Aminosäurenanalyse (Standardhydrolyse):

Analysengerät: Aminosäurenanalysator LC3000

Die Analyse erfolgt mittels Auftrennung des Probengemisches über eine Polymer-Kationenaustauschersäule, Partikelgröße 4µm, (125 x 4mm ID), Nachsäulen-Derivatisierung mit Ninhydrin bei 125 °C und photometrischer Detektion bei 570nm. Das Probenvolumen beträgt 20µL (Probenschleife).

Die Datenaufnahme erfolgt mit der Chromatographie-Software ChromStar 6.0.

Die angegebenen Absolutwerte in nmol beziehen sich auf die Einwaage.

Systemkalibrierung:

Die Kalibrierung des Systems erfolgt mit einem Standard der Firma Sigma-Aldrich (A2908).

Für die Standardhydrolyse betragen die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren 200nmol/mL.

Dem Standard wurde noch zusätzlich Cystein, allo-Isoleucin und Kynurenin (Abbauprodukt von Trp) zugesetzt (200nmol/mL).

Aminosäurenanalyse (oxidative Hydrolyse):

Analysengerät: Aminosäurenanalysator LC3000

Für die oxidierten Proben betragen die Konzentrationen der Aminosäuren 400nmol/mL. Dem Standard wurde noch zusätzlich Methioninsulfon (400nmol/mL) zugesetzt.

Für die Bestimmung von Methioninsulfon ist eine höhere Auflösung des Chromatogramms notwendig, was durch die Verwendung einer Trennsäule mit größerer Dimension erreicht wird.

Deshalb wird für die Analyse dieses Probengemisches mit eine Polymer-Kationenaustauschersäule, Partikelgröße 4µm, (150 x 4,6 mm ID) durchgeführt.

Die Datenaufnahme erfolgt mit der Chromatographie-Software ChromStar 6.0

Die angegebenen Absolutwerte in nmol beziehen sich auf die Einwaage.

Daten für die Auswertung

Sequenzdaten des Proteins

Nicht gegeben



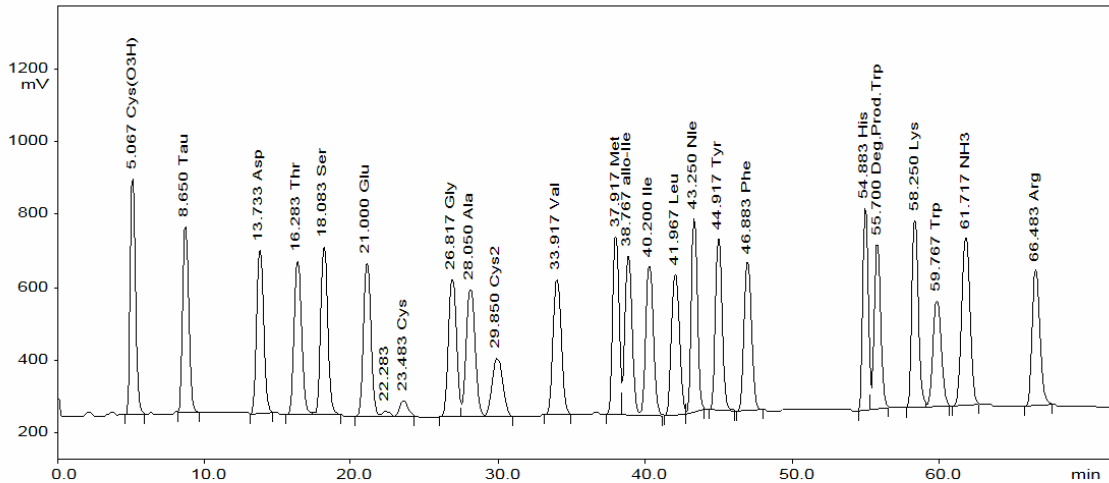
Anhang II zur Aminosäureanalytik

HPLC-Chromatogramme zur Aminosäurebestimmung einer Probe



Standardchromatogramm (570nm), 200nmol/ml

Sample Identifier: **Standard H 200**
 Chromatogram: I:\Genaxxon\Daten\2021\210427\ASA1\Chromatogramme\A1-5700002
 Injected on: 03.05.2021 Injected at: 13:46



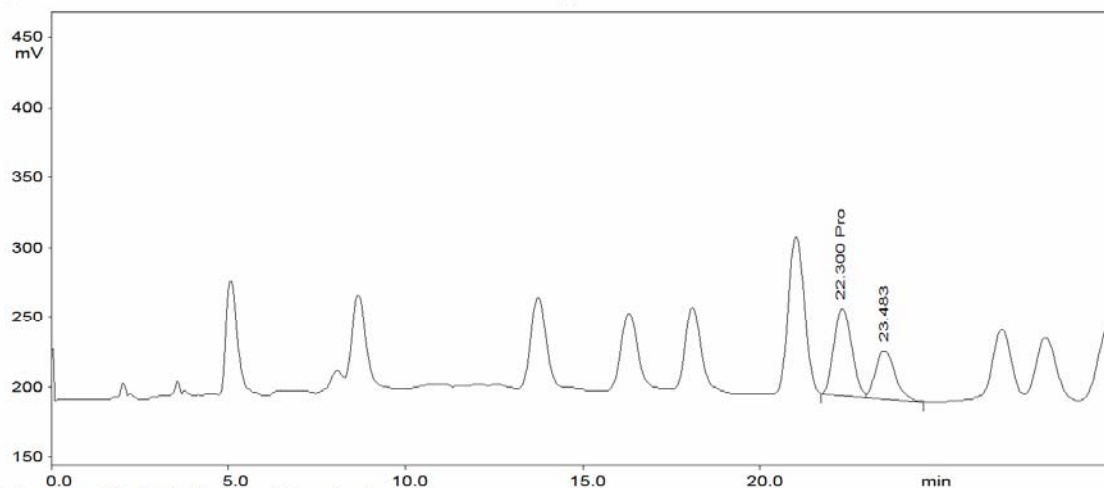
Calculation Method : External Standard

Calibration Method : One Point

Peak No.	Name	Retention Time	Area	Absolute nmol
1	Cys(O3H)	5.067	6664975	200.000
2	Tau	8.650	6387551	200.000
3	Asp	13.733	6563940	200.000
4	Thr	16.283	6724146	200.000
5	Ser	18.083	6838416	200.000
6	Glu	21.000	6585564	200.000
7		22.283	213792	0.000
8	Cys	23.483	752606	200.000
9	Gly	26.817	6581760	200.000
10	Ala	28.050	6788971	200.000
11	Cys2	29.850	3794611	200.000
12	Val	33.917	6606829	200.000
13	Met	37.917	6594470	200.000
14	allo-Ile	38.767	6503520	200.000
15	Ile	40.200	6533279	200.000
16	Leu	41.967	6532050	200.000
17	Nle	43.250	6558697	200.000
18	Tyr	44.917	6544787	200.000
19	Phe	46.883	6533086	200.000
20	His	54.883	6238869	200.000
21	Deg.Prod.Trp	55.700	5910692	200.000
22	Lys	58.250	6890822	200.000
23	Trp	59.767	5187494	200.000
24	NH3	61.717	8207053	200.000
25	Arg	66.483	6249018	200.000

Standardchromatogramm (440nm)

Sample Identifier: **Standard H 200**
Chromatogram: I:\Genaxxon\Daten\2021\210427\ASA1\Chromatogramme\A1-4400002
Injected on: 03.05.2021 Injected at: 13:46



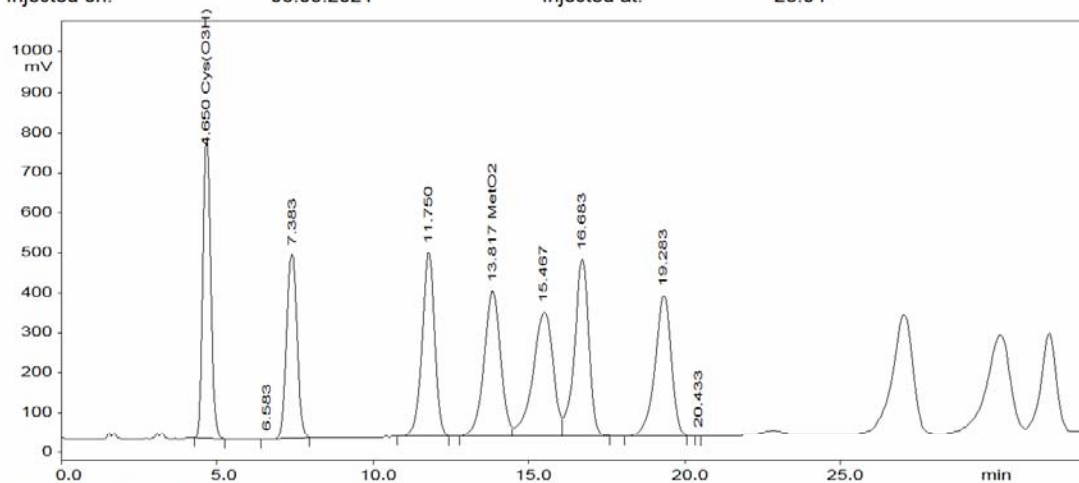
Calculation Method : External Standard

Calibration Method : One Point

Peak No.	Name	Retention Time	Area	Absolute nmol
1	Pro	22.300	1081740	200.000
2		23.483	648185	0.000

Standardchromatogramm 400nmol/ml (570nm)

Sample Identifier: **Standard H 400**
 Chromatogram: I:\Genaxxon\Daten\2021\210427\ASA4\Chromatogramme\lufa\A4-L5700060
 Injected on: 03.05.2021 Injected at: 23:04



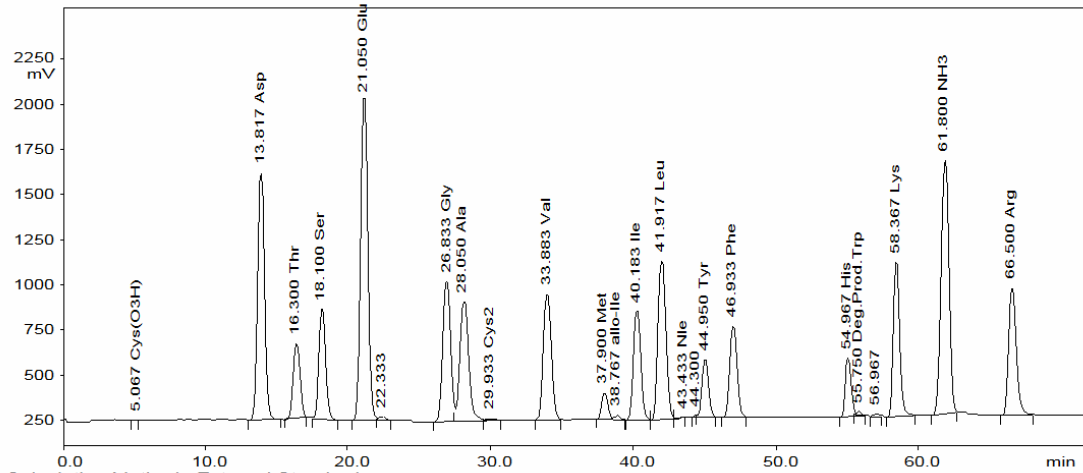
Calculation Method : External Standard

Calibration Method : One Point

Peak No.	Name	Retention Time	Area	Absolute nmol
1	Cys(O3H)	4.650	6152251	400.000
2		6.583	5651	0.000
3		7.383	5111270	0.000
4		11.750	6352224	0.000
5	MetO2	13.817	6724679	400.000
6		15.467	7006517	0.000
7		16.683	6918108	0.000
8		19.283	6411327	0.000
9		20.433	7452	0.000

Probe 1: (570nm): Probe (saure Hydrolyse)

Sample Identifier: **Probe**
 Chromatogram: I:\Genaxxon\Daten\2021\210427\ASA1\Chromatogramme\A1-5700003
 Injected on: 03.05.2021 Injected at: 15:31



Calculation Method : External Standard

Calibration Method : One Point

Factor: 1.000000e+002

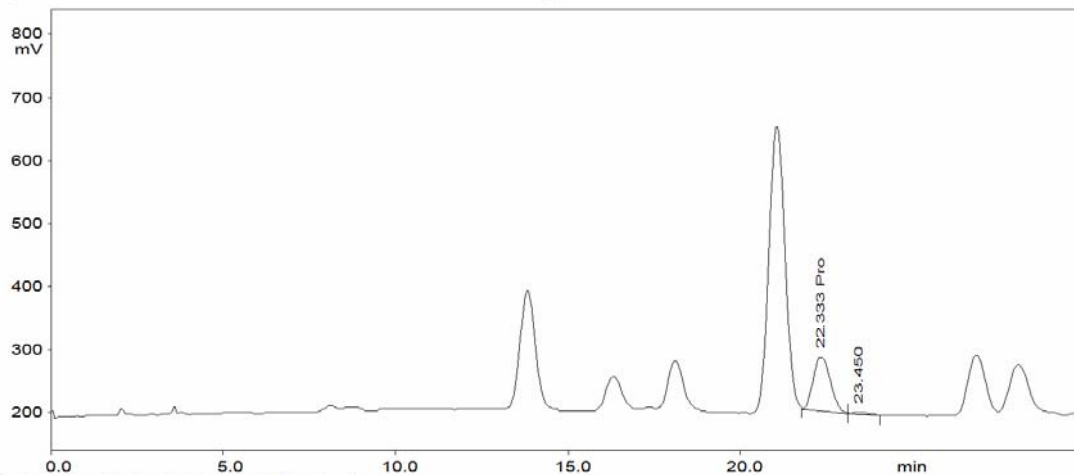
Peak No.	Name	Retention Time	Area	Absolute nmol
1	Cys(O3H)	5.067	34898	104.722
No Peak found in Win. No. 2: Tau				
2	Asp	13.817	20080468	61184.199
3	Thr	16.300	6327023	18818.814
4	Ser	18.100	8783255	25687.982
5	Glu	21.050	28249574	85792.430
6		22.333	251142	0.000
No Peak found in Win. No. 7: Cys				
7	Gly	26.833	13490592	40993.875
8	Ala	28.050	13273385	39102.793
9	Cys2	29.933	268776	1416.621
10	Val	33.883	12304832	37248.828
11	Met	37.900	1945196	5899.478
12	allo-Ile	38.767	276281	849.636
13	Ile	40.183	9605280	29404.164
14	Leu	41.917	15485926	47415.215
15	Nle	43.433	40626	123.886
16		44.300	16815	0.000
17	Tyr	44.950	4457875	13622.673
18	Phe	46.933	8048021	24637.729
19	His	54.967	4202717	13472.688
20	Deg.Prod.Trp	55.750	241255	816.335
21		56.967	173339	0.000
22	Lys	58.367	11540135	33494.219
No Peak found in Win. No. 22: Trp				
23	NH3	61.800	24451114	59585.617
24	Arg	66.500	11916744	38139.570

Probe 1: (440nm): Probe (saure Hydrolyse)Sample Identifier: **Probe**

Chromatogram: I:\Genaxxon\Daten\2021\210427\ASA1\Chromatogramme\A1-4400003

Injected on: 03.05.2021

Injected at: 15:31



Calculation Method : External Standard

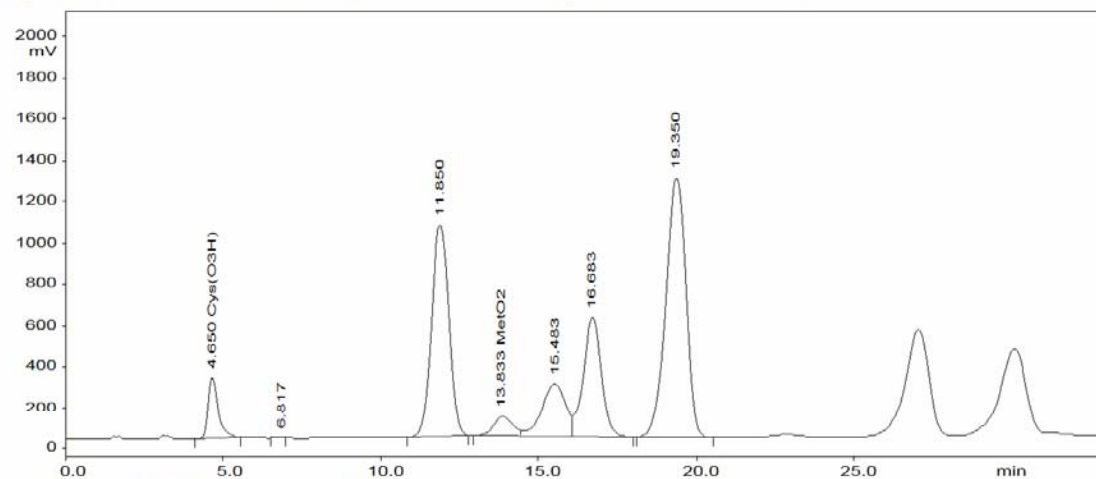
Calibration Method : One Point

Factor: 1.000000e+002

Peak No.	Name	Retention Time	Area	Absolute nmol
1	Pro	22.333	1435750	26545.201
2		23.450	32811	0.000

Probe 1: (570nm): Probe (Oxidation und saure Hydrolyse) – Verdünnung 1:50

Sample Identifier: **Probe**
 Chromatogram: I:\Genaxxon\Daten\2021\210427\ASA4\Chromatogramme\lufa\A4-L5700061
 Injected on: 04.05.2021 Injected at: 00:55



Calculation Method : External Standard

Calibration Method : One Point

Factor: 5.000000e+001

Peak No.	Name	Retention Time	Area	Absolute nmol
1	Cys(O3H)	4.650	3218486	10462.790
2		6.817	22491	0.000
3		11.850	19520806	0.000
4	Met(O2)	13.833	2043737	6078.318
5		15.483	6898730	0.000
6		16.683	11520709	0.000
7		19.350	27976094	0.000