

Praktikum Biochemie
für
Chemieingenieure

WS 2008/2009

TU Dresden

Inhaltsverzeichnis

1. Biochemisches Praktikum	1
1.1. Allgemeines.....	1
1.2. Sicherheitshinweise für das Labor.....	1
1.3. Auswertungen und Protokolle	2
1.4. Praktikumsplan.....	3
2. Reinigung von Lysozym aus Hühnereiweiß.....	4
2.1. Einleitung	4
2.2. Problemstellung.....	7
2.3. Materialien.....	7
2.4. Durchführung.....	7
2.4.1. Testverfahren	7
2.4.2. Isolierung von Lysozym aus Hühnereiweiß.....	8
3. Gelelektrophorese	11
3.1. Einleitung	11
3.1.1. Agarose-Gelelektrophorese	11
3.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	12
3.2. Problemstellung.....	15
3.3. Materialien.....	15
3.4. Versuchsdurchführung	17
3.4.1. SDS-PAGE.....	17
3.4.2. Coomassie-Färbung.....	19
3.4.3. Silberfärbung.....	19
4. Proteinbestimmung.....	20
4.1. Einleitung	20
4.1.1. Absorptionsmessung bei im UV-Bereich.....	20
4.1.2. Biuret-Reaktion	22
4.1.3. Lowry-Methode	22
4.1.4. Bradford-Methode	23
4.1.5. Vergleich der verschiedenen Methoden.....	23
4.2. Problemstellung.....	24
4.3. Materialien.....	24
4.4. Versuchsdurchführung	24
5. Enzymkinetik	27
5.1. Einleitung	27
5.2. Problemstellung.....	29
5.3. Materialien.....	29
5.4. Versuchsdurchführung	30
5.5. Auswertung	30
5.5.1. Ermittlung der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit	30
5.5.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_M nach Lineweaver-Burk	31
6. Anhang: Sicherheitshinweise und Regeln für das Arbeiten im Labor	32

1. Biochemisches Praktikum

1.1. *Allgemeines*

In Vorarbeit zum Praktikum ist es zwingend notwendig, sich gründlich auf die anstehenden Versuche vorzubereiten und das zugrunde liegende Skript gelesen und verstanden zu haben.

Vor Beginn des Praktikums findet am 05. Februar 2009 ein schriftliches Testat zum Inhalt des Praktikums und den durchzuführenden Versuchen statt. Das Bestehen des Testates sichert die Teilnahme am Praktikum. Alle Studenten finden sich um 9:00 am Haupteingang des Instituts für Polymerforschung (Hohe Str. 6) beim Empfang ein.

Das Praktikum beginnt für die jeweiligen Gruppen laut Plan. Am Montag den 09. März 2009 beginnen wir um 11:00 Uhr und an allen folgenden Tagen um 8:00 Uhr. Bei allen Gruppen, die donnerstags beginnen, sind wir darauf bedacht zügig zu arbeiten um den 3. Labortag *eventuell* entfallen zu lassen.

Während des Praktikums sind Notebooks nicht zugelassen. Graphische Darstellungen sollen auf Millimeterpapier (bitte mitbringen!) angefertigt werden. Für die Auswertung und das Protokoll bietet sich jedoch die Verwendung von Excel oder ähnlichen Programmen an.

Während des Praktikums empfiehlt es sich, das eigene Vorgehen exakt zu protokollieren und besonders auf Abweichungen des Versuchsablaufes vom Skript zu achten! Jede Gruppe soll ein Laborbuch oder Laborheft führen (keine lose Zettelsammlung), in welchem alle Schritte und Ergebnisse der Versuche festgehalten werden.

1.2. *Sicherheitshinweise für das Labor*

Im Anhang des Skriptes befindet sich eine Sicherheitsbelehrung für das Arbeiten im Labor. Diese Belehrung ist von allen sorgfältig zu lesen und wird vor Ort durch eine Unterschrift bestätigt.

Hier einige wichtige Hinweise:

- Labormäntel sind immer zu tragen! (Bitte eigenen Labormantel mitbringen!)
- Bei Arbeiten mit Säuren und Laugen sowie mit giftigen Substanzen (z.B. Acrylamid) ist das Tragen von Schutzbrille und Handschuhen zwingend vorgeschrieben!
- Essen, Getränke und Kosmetika sind im Labor verboten!
- Das Öffnen von unter Strom stehenden Elektrophoresekammern ist lebensgefährlich!
- Pipettieren mit dem Mund ist strengstens verboten!!

1.3. Auswertungen und Protokolle

Jede Gruppe fertigt ein eigenes Protokoll an. Dieses ist in elektronischer Form als Word- oder PDF-Dokument einzureichen. Das Protokoll soll sich in einer einzigen Datei befinden. Zusätzliche Dateien (z.B. Excel-Dateien) werden nicht angenommen. Die Protokolle sollen durchgehend in ganzen Sätzen formuliert werden. Auch die Versuchsdurchführung soll in ganzen Sätzen und nicht stichpunktartig formuliert werden! Das Protokoll zu jedem Versuch soll sich wie folgt gliedern:

Name der Protokollanten und der Versuchspartner, Gruppennummer

Titel des Versuches

Einleitung:

In der Einleitung soll lediglich kurz auf die dem Versuch zu Grunde liegende(n) Methode(n) eingegangen werden. Am Ende der Einleitung soll eine Zielstellung für den jeweiligen Versuch formuliert werden.

Durchführung:

In diesem Teil wird exakt beschrieben, wie der Versuch durchgeführt wurde, d.h. welche Methoden in welcher Reihenfolge angewandt wurden, unter genauer Angabe der verwendeten Reagenzien mit Namen, Konzentration, Menge/Volumen, u.U. kinetische Daten. Besonderes Augenmerk ist auf Abweichungen in der Versuchsdurchführung vom Skript zu legen, da dies für die Diskussion von sehr großer Wichtigkeit sein kann. Ein Verweis auf das Skript ist nicht zulässig. Dieser Teil muss so geschrieben sein, dass andere den Versuch mit Hilfe des Protokolls „nachkochen“ können!

Ergebnisse:

Dieses Kapitel soll übersichtlich alle erhaltenen Resultate darstellen. Daten sollen entweder in Tabellen oder als Kurven dargestellt werden. Dabei ist auf sinnvolle Maßstäbe, Achsenbeschriftungen und die korrekte Angabe der Einheiten zu achten. Tabellen und grafische Darstellungen sind mit einem Titel und einer Beschriftung zu versehen. Im Text müssen sich Verweise auf die entsprechenden Tabellen bzw. Abbildungen befinden.

Bei Berechnungen ist die verwendete Formel mit einer exemplarischen Rechnung anzugeben. Es ist zu bedenken, wie viele Nachkommastellen als signifikant angesehen werden können. Gele werden am Besten eingescannt und als Abbildung im Protokoll eingefügt. Die Bahnen/Spuren sind so zu beschriften, dass daraus ersichtlich wird, was auf die entsprechende Bahn aufgetragen wurde. Die Markerbanden sollen sinnvoll beschriftet werden.

Abschließend ist das erhaltene Ergebnis in ein bis zwei Sätzen zu formulieren.

Diskussion:

In diesem Kapitel erfolgt die Interpretation und Beurteilung der Ergebnisse, z.B.:

- Welche Aussagen kann ich über das untersuchte System treffen?
- Werden meine Erwartungen bestätigt?
- Stimmen die Ergebnisse mit bekannten Literaturwerten überein und wenn nicht, was kann die Ursache sein?
- Bin ich von der Versuchsvorschrift abgewichen und warum? Welche Folgen hatte dies bzw. kann ich dadurch das Ergebnis erklären?

Anhang:

Ein Anhang ist möglichst zu vermeiden. Lediglich große Mengen tabellarischer Daten (einige Seiten) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit als Anhang dem Protokoll hinzuzufügen. Im Protokoll muss auf den Anhang verwiesen werden und die entsprechenden Punkte müssen im Anhang kenntlich gemacht werden.

1.4. Praktikumsplan

1. Tag:

- Kurze Sicherheitsbelehrung im Labor
- Information über den Tagesablauf
- Versuchsablauf (Lysozymreinigung, Enzymkinetik, Gelelektrophorese, Proteinbestimmung)

Lysozymreinigung	SDS-PAGE	Spektrophotometrische Methoden
pH-Präzipitation Dialyse Herstellung der Säule für die Kationenaustauscherchromatographie	1x SDS Gel - Coomassie-Färbung	Enzymkinetik (ADH) Proteinbestimmung (Bradford)

2. Tag:

(Praktisch)

Lysozymreinigung	SDS-PAGE	Spektrophotometrische Methoden
Kationenaustauscherchromatographie Ammoniumsulfat-Präzipitation	1x SDS Gel (Lysozymreinigung)	Enzymkinetik (ADH/restl. Gruppen) Proteinbestimmung (Bradford/restl. Gruppen) Aktivitätstest Lysozym (beispielhaft für eine Gruppe)
- Konzentrationsbestimmung		

3. Tag:

(Praktisch)

- Beendigung der Restarbeiten

2. Reinigung von Lysozym aus Hühnereiweiß

2.1. Einleitung

Lysozym ist ein in Tieren und Pflanzen weit verbreitetes Enzym und ist beispielsweise in Speichel, Tränenflüssigkeit, Milch, Atemwegssekreten, Leukozyten und den Nieren von Säugetieren zu finden und trägt zum Schutz vor bakteriellen Infektionen bei. Lysozym ist ein monomeres Protein (MW 14.4 kD, 129 Aminosäuren, vier Disulfidbrücken, **Abbildung 1**) mit seinem isoelektrischen Punkt bei pH 11. Der Absorptionskoeffizient beträgt $\epsilon \approx 38680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Lysozym wurde 1922 von Alexander Fleming entdeckt. Die erste Kristallstruktur wurde 1965 von David Phillips gelöst.

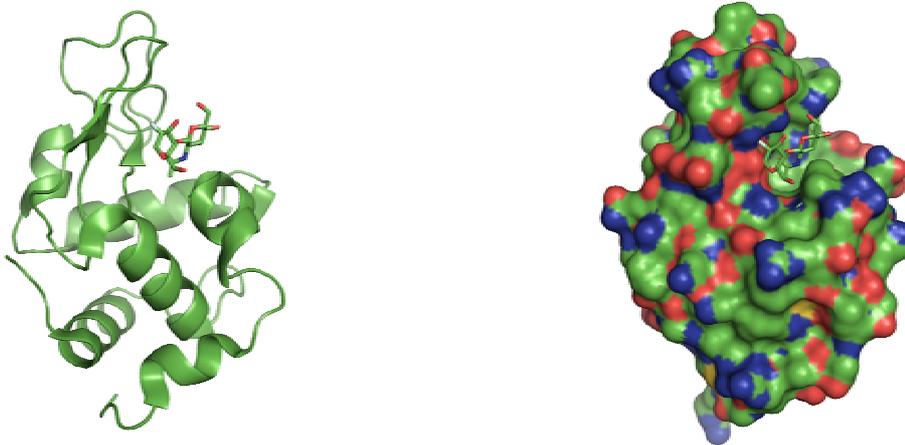


Abbildung 1 Tertiärstruktur von Lysozym mit gebundenem Substrat. Darstellung der Strukturelemente (links) und der Proteinoberfläche (rechts).

Lysozym katalysiert die Hydrolyse von Zellwänden grampositiver Bakterien und gehört somit zur Klasse der Glykolasen (Hydrolasen). Im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion bewirkt Lysozym eine Beschleunigung der Hydrolyse etwa um den Faktor 10^{10} . *Micrococcus luteus* weist eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Lysozym auf und wird deswegen gerne als Substrat für Lysozymtests verwendet. Des Weiteren werden auch die Zellwände einiger gramnegativer Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* hydrolysiert. Aber auch Verbindungen wie Chitin oder Oligomere von N-Acetylglucosamin werden langsam verdaut.

Der Polysaccharidanteil der in den Zellwänden auftretenden Peptidoglykane wird von Lysozym bevorzugt an der β -1,4-glycosidischen Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäuren (NAM) und N-Acetylglucosaminen (NAG) hydrolysiert

(Abbildung 2). Das Enzym weist eine charakteristische tiefe Furche auf der Proteinoberfläche auf (**Abbildung 1**). Diese ist die Bindungsstelle für das Substrat und kann sechs Zuckerreste binden. Nach dem von Phillips postulierten Katalysemechanismus findet die Hydrolyse zwischen dem vierten (D) und fünften (E) Ring statt.

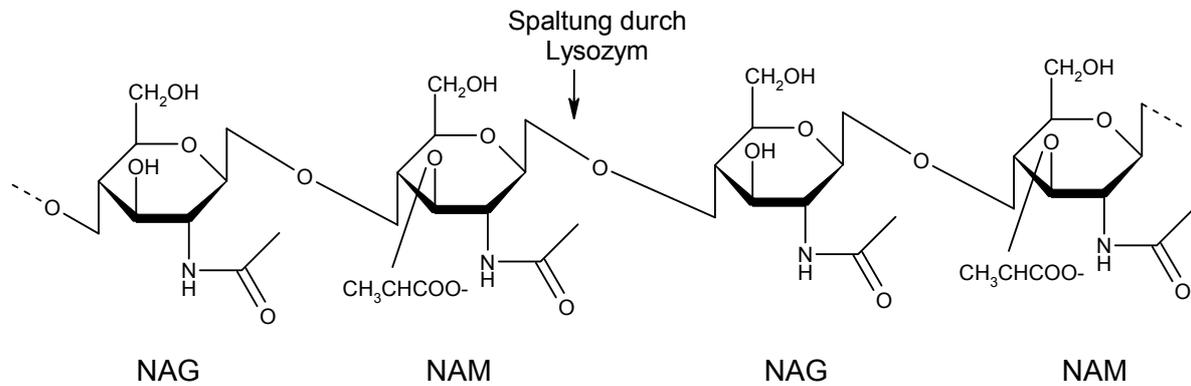


Abbildung 2 Alternierende NAG-NAM-Polysaccharidkomponente der bakteriellen Zellwände

An der Hydrolyse sind ein Glutamat und ein Aspartat beteiligt. Die Carboxylgruppe des Glutamates befindet sich in einer unpolaren Umgebung und weist einen unerwartet hohen pK-Wert auf (ist somit protoniert), was für die Katalyse unabdinglich ist. Die Hydrolyse verläuft unter Ausbildung eines Oxonium-Ions im Übergangszustand ab und resultiert in einem Halbacetal mit erhaltener β -Konfiguration. Diese wird erhalten, da eine Seite des Oxonium-Ions durch die enzymatische Spalte geschützt wird (**Abbildung 3**).

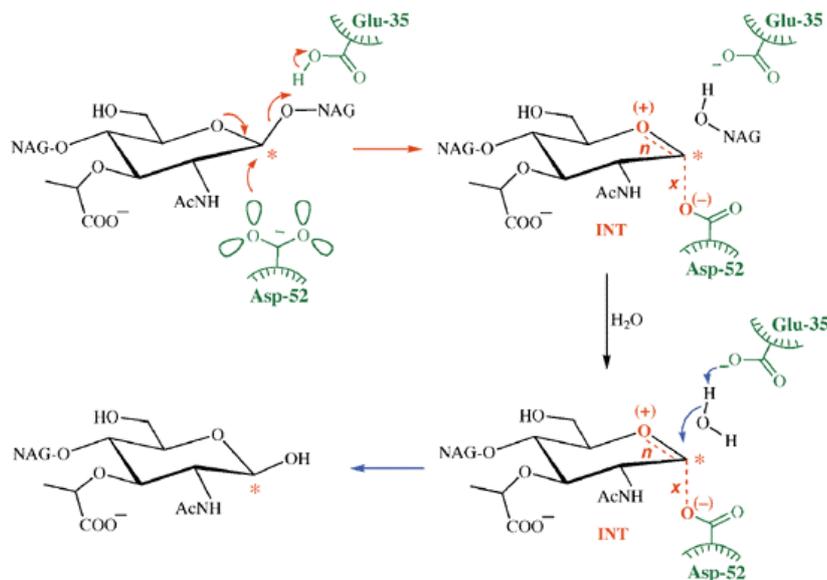


Abbildung 3 Reaktionsmechanismus für die Hydrolyse von Peptidoglykan durch Lysozym

Die enzymatische Aktivität von Lysozym kann beispielsweise durch $(\text{NAG})_3$ inhibiert werden. Dies liegt daran, dass dieses Molekül in der enzymatischen Spalte bindet, aber nicht hydrolysiert wird. Somit wird die Bindung anderer Substrate verhindert. Ein anderer Inhibitor ist das δ -Lacton-Analogon von $(\text{NAG})_4$. Der in der Halbsesselkonformation vorliegende Lactonring ist ein Übergangszustandsanalogon, da es geometrisch dem Oxonium-Ion-Übergangszustand ähnelt. Die inhibierende Wirkung rührt daher, dass Enzyme oft die Eigenschaft haben, den Übergangszustand fester zu binden als das Molekül in seinem Grundzustand. Somit werden stabile Moleküle, die dem Übergangszustand ähneln, stärker gebunden als das natürliche Substrat, und verhindern somit dessen Bindung.

Ein Nachweis von Lysozym basiert auf dieser Reaktion. Das Enzym wird mit einer Suspension gefriergetrockneter Bakterien gemischt. Durch Hydrolyse der Zellwände nimmt die Trübung der Suspension ab. Dies kann im UV/Vis-Spektrophotometer bei 450 nm verfolgt werden. Die Aktivität von Enzymen wird in Einheiten (*units*) definiert. Als ein Einheit Lysozym ist die Menge Protein definiert, die (unter optimalen Bedingungen) eine Abnahme der Trübung (und somit der Lichtstreuung) bei 450 nm um 0,001 pro Minute bei pH 7,0 und 25°C hervorruft. Die relative Aktivität und die Gesamtaktivität des Enzyms sind wie folgt definiert:

$$U_{\text{rel}} = \frac{\Delta A_{450} / \text{min} \cdot 10^3}{\text{mg Protein}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (1)$$

$$U_{\text{tot}} = U_{\text{rel}} \cdot \text{mg Gesamtprotein} \quad (2)$$

Die Isolierung von Lysozym beruht hauptsächlich auf zwei Reinigungsschritten. Im ersten Schritt, der pH-Präzipitation, wird die Tatsache genutzt, dass der pI von Lysozym bei etwa 11 liegt, und der der meisten anderen Proteine im Hühnereiweiß im sauren pH-Bereich. Bei einem pH-Wert in der Nähe des pI nimmt die Löslichkeit von Proteinen stark ab, was dazu führt, dass diese aggregieren und ausfallen. Im zweiten Reinigungsschritt, der Kationenaustauscherchromatographie, wird wiederum die Tatsache des hohen pI von Lysozym genutzt. Lysozym ist bei dem verwendeten pH-Wert noch positiv geladen und kann somit an die Kationenaustauschermatrix binden. Andere Proteine hingegen sind meist, soweit sie im ersten Schritt nicht entfernt wurden, negativ geladen und binden somit nicht an die carboxymethylierte Matrix. Im letzten Schritt, der Ammoniumsulfatfällung wird das Protein konzentriert. Die Fällung mit Ammoniumsulfat ist nicht denaturierend.

2.2. Problemstellung

Aus dem Eiklar von Hühnereiern soll mittels pH-Präzipitation und Kationenaustausch-Chromatografie das Enzym Lysozym isoliert werden. Die Aktivität des Enzyms wird durch Trübungsmessung von *Micrococcus luteus*-Suspensionen überwacht.

2.3. Materialien

Testpuffer	0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,0
Säulenpuffer A	0,1 M Ammoniumacetat, pH 4,5
Säulenpuffer B	0,1 M Ammoniumacetat, pH 7,0
Säulenpuffer C	0,1 M Ammoniumacetat, 0,025 M Na ₂ CO ₃ , pH 10,0
Säulenpuffer D	0,1 M Ammoniumacetat, 0,25 M Na ₂ CO ₃ , pH 10,0
Proteinpuffer E	0,1 M Ammoniumacetat, 0,25 M Na ₂ CO ₃ , pH 7,0
Bakteriensuspension	0,3 mg/ml gefriergetrocknete <i>Micrococcus luteus</i> Bakterien suspendiert in Testpuffer
Hilfsmittel	5x2 cm Carboxymethylcellulose CM-52 Säule in Säulenpuffer A äquilibriert, Dialyseschlauch MWCO ~10000

2.4. Durchführung

2.4.1. Testverfahren

2.4.1.1. Konzentrationsbestimmung des Enzyms

Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wird durch Absorptionsmessung bei 280 nm ermittelt. Da die Zusammensetzung des Proteingemisches nicht bekannt ist, kann in guter Näherung folgende Beziehung verwendet werden:

$A_{280}=1,0$ entspricht 1 mg Protein pro ml

Für die Messung der Proteinkonzentration isolierter Proteine ist diese Näherung zu ungenau. In diesen Fällen muss der jeweilige Extinktionskoeffizient verwendet werden. Im Fall von Lysozym beträgt dieser $\epsilon_{280} \approx 38680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Für die Proteinbestimmung sind geeignete Vorverdünnungen mit Testpuffer herzustellen. Als Referenz ist Testpuffer zu verwenden. Die Absorption soll nicht geringer als 0,1 und nicht höher als 1,0 sein (linearer Messbereich des Photometers). Die gemessenen Absorptionswerte sind in Tabelle 1 einzutragen.

2.4.1.2. Enzymtest für Lysozym

Die Stammlösung der *Micrococcus luteus* Bakteriensuspension wird 10 min bei 37°C vorinkubiert und vor Gebrauch gut durchmischt. Von dieser Suspension werden 2,8 ml in eine Küvette gefüllt und die Trübung bei 450 nm gemessen. Durch Zugabe von 0,2 ml Lysozymlösung einer geeigneten Vorverdünnung (mit

Testpuffer herstellen) wird die Reaktion gestartet ($t=0$). Die Abnahme der Absorption wird bei 450 nm und Zimmertemperatur für mindestens fünf Minuten in Abständen von 10 s verfolgt. Bei der Herstellung der Vorverdünnung ist darauf zu achten, dass die gemessene Absorption A_t in den ersten fünf Minuten linear abnimmt und die Änderung der Absorption bei 450 nm zwischen 0,01 und 0,04 pro Minute liegt. Achtung: eine Kontamination der Bakterienstammlösung mit Spuren von Lysozym ist unter allen Umständen zu vermeiden!

2.4.2. Isolierung von Lysozym aus Hühnereiweiß

2.4.2.1. Extraktion

Das Eiweiß eines Hühnereis wird vorsichtig vom Eidotter getrennt. Die Eischnur wird entfernt. Das Eiweiß wird unter Rühren mit dem doppelten Volumen an Testpuffer verdünnt und mit einem Mixer homogenisiert. Nach Filtration durch ein Sieb erfolgt Zentrifugation für 5 min bei 5°C und ~27500 g. Ein Aliquot des Rohextraktes von 500 µl wird zur Aktivitäts- und Proteinbestimmung im Eisbad aufbewahrt. Empfohlene Verdünnung für die Proteinbestimmung 100:1 und für den Aktivitätstest 3000:1.

2.4.2.2. pH-Präzipitation

Zu dem klaren Extrakt wird langsam (!) Eisessig getropft, bis der pH-Wert 4,5 erreicht (Kontrolle mit pH-Glaselektrode). Die Lösung wird für 30 min auf Eis weitergerührt und anschließend wird der entstandene Niederschlag 20 min bei 5°C und ~27500 g abzentrifugiert. Der das Lysozym enthaltende Überstand wird vorsichtig dekantiert, aufbewahrt und ein 500 µl Aliquot wird für die Aktivitäts- und Proteinbestimmung entnommen. Empfohlene Verdünnungen: 1:100 für die Proteinbestimmung; 1:3000 für den Aktivitätstest.

2.4.2.3. Dialyse

Der Überstand der pH-Präzipitation wird in einen Dialyseschlauch gefüllt und 12 h bei 4°C gegen 500 ml Säulenpuffer A über Nacht dialysiert. Danach wird die Lösung aus dem Schlauch entnommen und 5 min bei ~27500 g und 5°C zentrifugiert. Der klare Überstand wird abgenommen, ein 500 µl Aliquot wird für

Protein- und Aktivitätsbestimmung aufgehoben. Empfohlene Verdünnungen: 1:100 für die Proteinbestimmung; 1:3000 für den Aktivitätstest.

2.4.2.4. Chromatographie auf CM-Cellulose-Kationentauscher

Die Lösung wird auf eine in Säulenpuffer A äquilibrierte 5x2 cm CM-Cellulose Säule aufgetragen und es wird mit dem Sammeln von Eluat in einem 150 ml Becherglas begonnen. Mit Säulenpuffer A wird solange gewaschen, bis 100 ml Eluat gesammelt wurden (Eluat 1). Der Flüssigkeitsmeniskus sollte jetzt knapp oberhalb des Gels in der Säule stehen. Anschließend wird mit 100 ml Säulenpuffer B eluiert (Eluat 2). Die Säule wird mit weiteren 100 ml Säulenpuffer C gewaschen und das Eluat gesammelt. Zum Schluss wird die Säule mit Säulenpuffer D überschichtet und solange gewaschen, bis 25 ml Eluat 4 gesammelt wurden. Dieses wird sofort mit Essigsäure auf pH 7,5 gebracht. Von jedem der vier Eluate wird nach gründlichem Mischen je ein Aliquot von 500 µl zur Protein- und Aktivitätsbestimmung entnommen. Empfohlene Verdünnungen: 1:25-50 für die Proteinbestimmung; 1:5000 für den Aktivitätstest.

2.4.2.5. Ammoniumsulfatfällung

Das erhaltene Eluat 4 wird unter Rühren auf Eis solange portionsweise mit fein pulverisiertem Ammoniumsulfat versetzt, bis eine 70%ige Sättigung der Lösung erreicht ist (etwa 440 g/l Ausgangsvolumen). Dieser Schritt sollte etwa 15 Minuten dauern und die Stabilität des pH-Wertes sollte während der Ammoniumsulfatzugabe kontrolliert werden. Anschließend wird 30 min weiter auf Eis gerührt. Das Proteinpräzipitat wird durch Zentrifugation vom Überstand getrennt (20 min, 5°C, ~27500 g). Der Überstand wird möglichst vollständig abgenommen und verworfen. Der Niederschlag wird in einem möglichst geringen Volumen Enzympuffer E gelöst. Zunächst sollte lediglich 1 ml Puffer E zugegeben werden. Durch vorsichtiges Schütteln (Schaumbildung vermeiden) wird das Präzipitat gelöst. Falls notwendig schrittweise mehr Puffer E zugeben (maximal 3 ml Endvolumen). Schließlich nochmals bei Zimmertemperatur 2 min in der Tischzentrifuge bei 5000 U/min zentrifugieren und den Überstand abnehmen. Empfohlene Verdünnungen: 1:25-100 für die Proteinbestimmung; 1:3000-5000 für den Aktivitätstest.

Tabelle 1 Reinigungsverlauf für Lysozym aus Hühnereiweiß

Reinigungs- stufe	Gesamt- volumen (ml)	Absorption (A₂₈₀)	Protein- konzentration (mg/ml)	Gesamtprotein (mg)	Protein- ausbeute (%)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Gesamt- aktivität (U)	Aktivitäts- ausbeute (%)
nach Extraktion								
nach pH- Präzipitation								
nach Dialyse								
CM-Cellulose Eluat 1								
CM-Cellulose Eluat 2								
CM-Cellulose Eluat 3								
CM-Cellulose Eluat 4								
Endprodukt nach Fällung								

3. Gelelektrophorese

3.1. Einleitung

Die Elektrophoresetechnik ist in der Biochemie ein sehr wichtiges analytisches Hilfsmittel, um das Molekulargewicht und die Reinheit von Makromolekülen (Proteine, Peptide, Oligonukleotide, Nukleinsäuren) zu bestimmen. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Moleküle wie DNA, RNA und Proteine Ladungen tragen und sich somit im elektrischen Feld je nach ihrer Mobilität bewegen können. Dabei wirken auf die Moleküle beschleunigende und abbremsende Kräfte. Die beschleunigende Kraft ist abhängig von der elektrischen Feldstärke (E) und der elektrischen Ladung (q) pro Teilchen:

$$F = E \cdot q \quad (3)$$

Durch Reibungskräfte wird die Wanderung der Moleküle verlangsamt. Die Reibungskraft ist abhängig vom Molekülradius (r), der Viskosität des Mediums (η) und der Wanderungsgeschwindigkeit (v) des Moleküls:

$$F = 6\pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad (4)$$

Somit ergibt sich nach der Theorie die folgende Wanderungsgeschwindigkeit:

$$v = \frac{E \cdot q}{6\pi \cdot r \cdot \eta} \quad (5)$$

Im Fall von Makromolekülen weicht die Wanderungsgeschwindigkeit allerdings von der obigen Gleichung ab, da die Moleküle meist keine Kugelform aufweisen. Darüber hinaus können der Dissoziationsgrad, Inhomogenitäten im elektrischen Feld, Ionenstärke und pH-Wert des Puffersystems, Temperaturschwankungen (Änderung der Viskosität) und Eigenschaften des Trägermaterials die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle beeinflussen. Je nach Trägermaterial kann es beispielsweise zu Sieb- oder Chromatographieeffekten kommen.

In der täglichen Laborpraxis werden die Agarose- und die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Diese Methoden erlauben eine schnelle und einfache Analytik von Nukleinsäuren und Proteinen.

3.1.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Analytik von Nukleinsäuren eingesetzt. Agarose ist ein ungiftiges Polysaccharid aus roten Meeralgen. Das Polymer besteht aus alternierend 1,3-verknüpfter β -D-Galaktopyranose und 1,4-verknüpfter 3,6-Anhydro- α -L-Galactopyranose. Es lässt sich durch Erhitzen in Wasser/Puffer lösen

und erzeugt beim Abkühlen ein poröses Gel. In der Praxis werden Agarose-Gele mit Konzentrationen von 0,3 – 2,0 % (w/v) Agarose verwendet. Mit diesen Gelen können Oligonukleotide und Nukleinsäuren von 70 bp bis 50 kb getrennt werden. Dieser große Trennungsbereich geht zu Lasten der Trennauflösung, die bei Agarose-Gelen eher gering ist.

Die Detektion von DNA im Agarose-Gel erfolgt mit Ethidiumbromid. Dieses lagert sich zwischen die Basenpaare von Doppelstrang-DNA, es interkaliert (**Abbildung 4**). Dieser Effekt erklärt auch die Toxizität von Ethidiumbromid. Nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert Ethidiumbromid im sichtbaren Wellenlängenbereich, wobei die Fluoreszenzintensität von interkaliertem Ethidiumbromid etwa 50 – 100 fach grösser ist als die von freiem Ethidiumbromid.

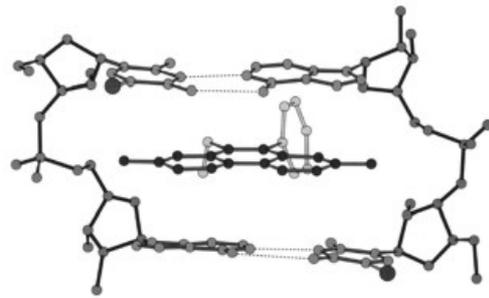


Abbildung 4 Ethidiumbromid zwischen zwei Basenpaaren interkaliert

3.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird Polyacrylamid als Trägermaterial eingesetzt. Es bildet im Vergleich zu Agarose kleinere Poren woraus ein kleinerer Trennbereich dieser Matrix resultiert. Die Trennauflösung wird so jedoch deutlich erhöht. Zur Herstellung des Gels werden Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid radikalisch polymerisiert (**Abbildung 5**). N,N'-Methylenbisacrylamid dient dabei als Quervernetzer zwischen den einzelnen Polyacrylamid-Ketten. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat, das in Radikale zerfällt, gestartet. TEMED dient dabei als Radikalstabilisator und Katalysator.

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, das stark an hydrophobe Bereiche von Proteinen bindet (etwa 1,4 g SDS an 1 g Protein) und dieses dabei denaturiert. Dabei wird eine stark negative Ladung eingeführt, welche die Eigenladung der Proteine überdeckt. Das resultierende Verhältnis von Proteinmasse zu Ladung ist bei allen Proteinen etwa gleich, sodass die SDS-Protein-Komplexe bei der SDS-PAGE (a) ausschließlich zur Anode und (b) unabhängig von ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrem isoelektrischen Punkt wandern. Die Auftrennung der Proteine erfolgt durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels und die Beweglichkeit der Proteine in der Gelmatrix ist eine lineare Funktion des

Logarithmus des Molekulargewichtes (**Abbildung 6**). Um schnell eine Aussage über das Molekulargewicht eines Proteins machen zu können, wird zum Vergleich in der Regel ein Proteingemisch aus Proteinen bekannter Größe auf das Gel aufgetragen (Marker).

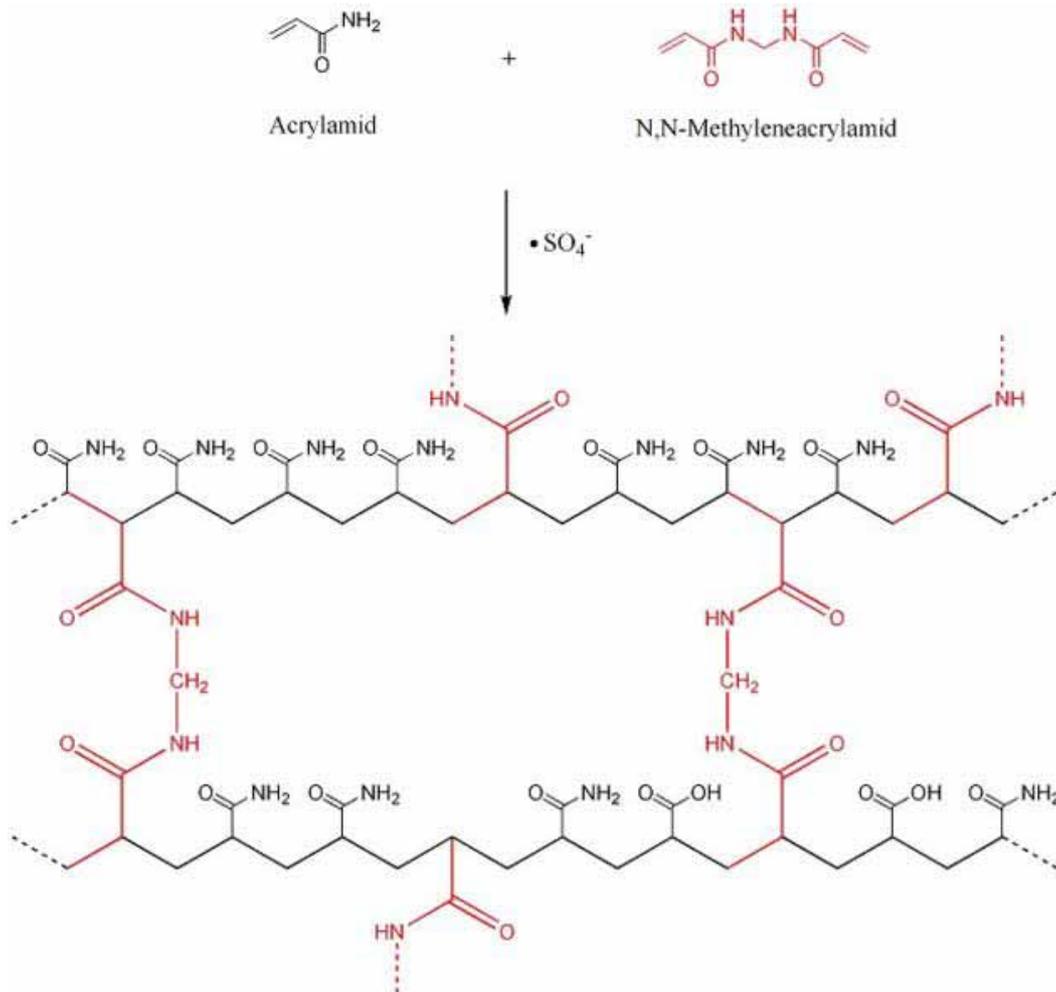


Abbildung 5 Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid zur einem quervernetzten Polyacrylamid-Gel

Bei der Probenvorbereitung werden die Proteine zunächst kurz (5 min) mit SDS gekocht, um sicherzustellen, dass alle Proteine denaturiert und in einer entfalteten, stabförmigen Konformation vorliegen. Oft wird den Proben bei diesem Schritt noch ein Reduktionsmittel (DTT, 2-Mercaptoethanol) zugesetzt, welches dafür sorgt, dass Disulfidbrücken gespalten werden. Somit können beispielsweise die Molekulargewichte einzelner Untereinheiten von Proteinkomplexen ermittelt werden.

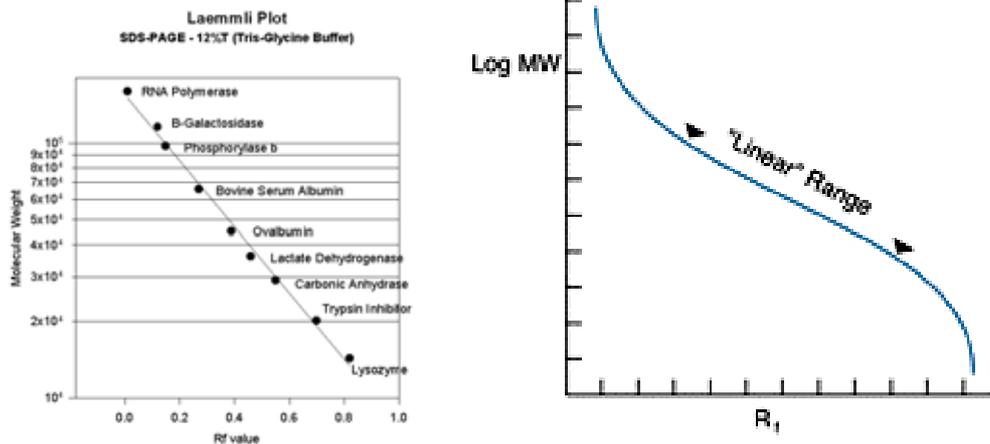


Abbildung 6 Laufverhalten von Proteinen verschiedenen Molekulargewichts; $R_f \text{ value} = (\text{Wanderungsstrecke des Proteins}) / (\text{Wanderungsstrecke der Laufmittelfront})$

Für die Detektion der Proteine im Polyacrylamid-Gel stehen mehrere Methoden zur Verfügung:

3.1.2.1. Coomassie-Färbung

Das Gel wird nach Beendigung der Elektrophorese in eine Lösung mit Coomassie Brilliant Blau (**Abbildung 7**) eingelegt. Dabei lagert sich der Farbstoff an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an. Diese Methode färbt alle Proteine und ist somit unspezifisch. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt im unteren μg -Bereich.

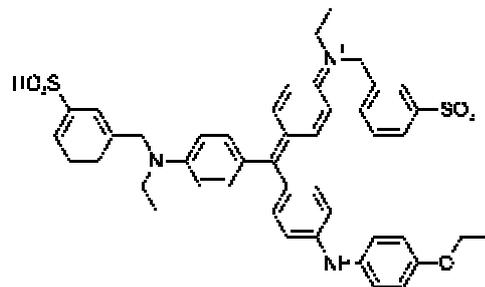


Abbildung 7 Strukturformel von Coomassie Brilliant Blau

3.1.2.2. Silberfärbung

Die Proteine werden im Gel fixiert und mit Silbernitrat-Lösung inkubiert. Dabei lagern sich die Silberionen an die Proteine an. Anschließend werden sie mit Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert. Diese Methode ähnelt der Entwicklung von photographischen Filmen. Die Empfindlichkeit ist etwa 100-mal höher als die Coomassie-Färbung. Auch dieses Verfahren ist unspezifisch.

3.1.2.3. Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine nicht direkt im Gel gefärbt. Die Methode beruht auf der spezifischen Erkennung eines Antigens durch einen Antikörper. Dazu werden die Proteine zuerst elektrophoretisch von dem Gel auf eine Membran übertragen. Anschließend werden diese Membranen mit spezifischen Antikörpern inkubiert, welche die entsprechenden Moleküle binden. Die Visualisierung erfolgt über einen zweiten Antikörper, der an den ersten (primären) bindet (Sandwichsystem). Dabei ist der sekundäre Antikörper kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym (Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase) gekoppelt. Das Enzym katalysiert eine Reaktion, bei der entweder Photonen oder ein Farbstoff freigesetzt werden (**Abbildung 8**). Diese Detektionsmethode erlaubt den spezifischen Nachweis von sehr kleinen Mengen an Proteinen.

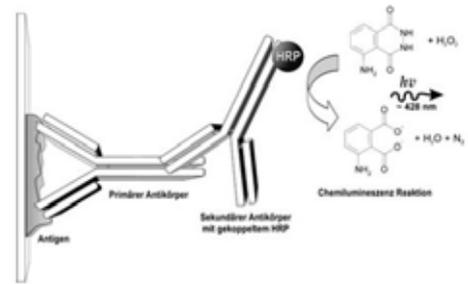


Abbildung 8 Schema eines Western Blot mit Detektion über Chemilumineszenz

3.2. Problemstellung

Mit Hilfe eines Polyacrylamid-Gels soll die Nachweisgrenze der Coomassiefärbung bestimmt werden. Dazu soll auf einem Gel eine Reihe verschiedener Proteinkonzentrationen von Albumin aus Rinderserum (*bovine serum albumin*, BSA) aufgetragen und anschließend mit Coomassie detektiert werden.

3.3. Materialien

SDS-PAGE

Acrylamid-Lösung:	30% Acrylamid Mix (enthält Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)
Tris-Puffer Trenngel:	1,5 M Tris, pH 8,8
Tris-Puffer Sammelgel:	1,0 M Tris, pH 6,8
SDS-Lösung:	10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
Stabilisator:	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)
Laufpuffer (10x):	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS

Probenpuffer (2x): 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 25 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 200 mM Dithiothreitol (DTT)

Proteinlösung 1 mg/ml BSA in PBS

Coomassie-Färbung

Färbelösung: 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250 in 10 % (v/v) Eisessig, 45 % (v/v) Methanol in H₂O

Entfärbelösung: 7 % (v/v) Eisessig, 5 % (v/v) Methanol in H₂O

Silberfärbung

Fixierer: 50 % (v/v) Methanol / 5 % (v/v) Essigsäure

Waschlösung: 50 % (v/v) Methanol

Sensitivierung: 0.02 % (w/v) Natriumthiosulfat-Lösung

Färber: 0.1 % (w/v) AgNO₃-Lösung

Entwickler: 0.04 % (v/v) Formaldehyd, 2 % (w/v) Na₂CO₃-Lösung

Stopp-Lösung: 5 % (v/v) Essigsäure

3.4. Versuchsdurchführung

3.4.1. SDS-PAGE

Acrylamid ist giftig! Schutzbrille und Handschuhe zum Selbstschutz tragen!

APS und TEMED sind für die Polymerisation wichtig. Diese Komponenten erst ganz zum Schluss zugeben!

Die Gelgießkammer wird nach Anleitung der Betreuer zusammengesetzt. Anschließend wird die Lösung für das Trenngel in einem 50 ml Plastikröhrchen zusammenpipettiert (**Tabelle 2**). Die Lösung wird dann sofort bis etwa 1,5 – 2 cm unterhalb der Glaskante in den Raum zwischen den beiden Glasplatten eingefüllt und vorsichtig mit ddH₂O überschichtet (**Abbildung 9A**). Der im Röhrchen verbleibende Rest wird aufgehoben, um die

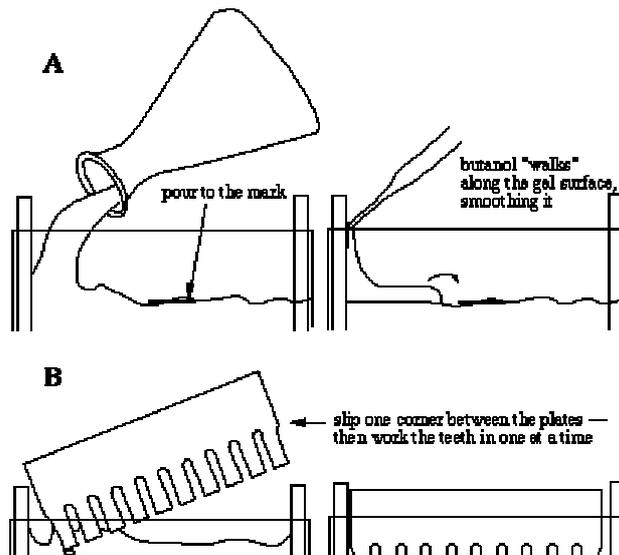


Abbildung 9: A. Gießen und Überschichten des Trenngels. B. Gießen und Einsetzen des Kamms zur Erzeugung der Probenfächerchen

Polymerisation zu verfolgen. Nach erfolgter Polymerisation wird die Lösung für das Sammelgel in einem weiteren Röhrchen zusammenpipettiert (**Tabelle 3**). Das Wasser auf dem Trenngel wird abgegossen und die Gießkammer mit der Lösung für das Sammelgel bis zum Rand aufgefüllt. Anschließend wird der Kamm eingesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass unterhalb der Zähne keine Luftblasen eingeschlossen werden. Dies ist am Besten zu erreichen, wenn der Kamm schräg von einer Seite her in die Kammer eingesetzt wird (**Abbildung 9B**).

Um den Versuchsablauf zu vereinfachen und das Arbeiten mit giftigem Acrylamid zu minimieren wird mit allen Gruppen zusammen, exemplarisch, ein Gel gegossen. Jede Gruppe erhält dann ein vorbereitetes Gel für Ihre Versuchsdurchführung.

Tabelle 2 Pipettierschema für ein 12%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel (Trenngel)

Komponente	Zu pipettierendes Volumen (ml) für 10 ml Lösung (1 Gel)	Zu pipettierendes Volumen (ml) für 20 ml Lösung (2 Gele)
ddH ₂ O	3,3	6,6
30 % Acrylamid Mix	4,0	8,0
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5	5,0
10 % SDS	0,1	0,2
10 % APS	0,1	0,2
TEMED	0,004	0,008

Tabelle 3 Pipettierschema für ein 5%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel (Sammelgel)

Komponente	Zu pipettierendes Volumen (ml) für 3 ml Lösung (1 Gel)	Zu pipettierendes Volumen (ml) für 6 ml Lösung (2 Gele)
ddH ₂ O	2,1	4,2
30 % Acrylamid Mix	0,5	1,0
1, M Tris, pH 6,8	0,38	0,76
10 % SDS	0,03	0,06
10 % APS	0,03	0,06
TEMED	0,003	0,006

Für die Proben wird eine BSA-Stammlösung (20 mg/ml) bereitgestellt. Ausgehend von dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe pipettiert. Es sollen je 30 µl Lösung mit den folgenden Proteinkonzentrationen hergestellt werden (mit PBS verdünnen): 500, 250, 100, 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,01 µg/ml. Zu den 30 µl Proteinlösung werden jeweils 30 µl 2x Probenpuffer gegeben. Die Eppendorfgefäße werden fest verschlossen und für 5 min bei 95 °C inkubiert.

Die Gele werden in die Elektrophoresekammern eingesetzt und die Reservoirs werden mit 1x Laufpuffer befüllt. Der Kamm wird vorsichtig entfernt und die entstandenen Geltaschen werden durch Pipettieren mit dem Laufpuffer vorsichtig gespült.

Anschließend werden in die 12 Taschen des Gels je 20 µl der verschiedenen Proteinlösungen pipettiert. Dabei wird in der linken Proben tasche mit der höchsten Proteinkonzentration begonnen und dann werden in abnehmender Reihenfolge die restlichen Proteinlösungen in die Geltaschen pipettiert. Das Gel wird solange bei 80 V laufen gelassen, bis die Proteine das Sammelgel passiert haben. Dann wird die Spannung auf 100 V erhöht. Das Gel wird solange laufen gelassen, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat.

Die Gelformen werden aus der Elektrophoresekammer entnommen. Das Gel wird nun mit Coomassie gefärbt.

3.4.2. Coomassie-Färbung

Die obere Glasplatte wird entfernt und das Gel von der unteren Glasplatte in die Färbelösung überführt. Das Gel ist sehr weich und es ist mit äußerster Vorsicht zu behandeln, um ein Einreißen des Gels zu verhindern! Bei der Handhabung des Gels sind immer Handschuhe zu tragen, da (1) unpolymerisiertes und somit giftiges Acrylamid anhaften kann und (2) Fingerabdrücke bei der Färbung sichtbar werden können und somit die Auswertung erschweren.

Nach etwa 45 min wird die Färbelösung in bereitgestellte Abfallgefäße abgegossen und durch Entfärbelösung ersetzt. Nun wird solange entfärbt, bis die Proteinbanden zu erkennen sind und der Hintergrund verschwunden ist. Gegebenenfalls ist die Entfärbelösung auszutauschen. Die verbrauchte Entfärbelösung wird gesondert gesammelt.

3.4.3. Silberfärbung

Um die Nachweisgrenze für Proteine zwischen Coomassie- und Silberfärbung zu vergleichen wird einer der Praktikumsbetreuer parallel zum Versuch ein identisches Gel mit denselben BSA Proben laufen lassen. Im Anschluss wird dieses Gel Silber gefärbt und kann dann mit den Gelen der einzelnen Gruppen verglichen werden.

Zur Information hier das vollständige Färbeprotokoll.

Das Gel ist sehr weich und es ist mit äußerster Vorsicht zu behandeln, um ein Einreißen des Gels zu verhindern! Bei der Handhabung des Gels sind immer Handschuhe zu tragen.

Die obere Glasplatte wird entfernt und das Gel von der unteren Glasplatte in die Fixierlösung überführt und für 20 min inkubiert. Anschließend wird das Gel 10 min in der Waschlösung und danach 2 h in ddH₂O gewaschen. Zur Sensitivierung wird das Gel 1 – 2 min in der Natriumthiosulfatlösung inkubiert und anschließend zweimal für 1 min mit ddH₂O gewaschen. Dann wird das Gel für 20 – 40 min mit eiskaltem Färber bei 4°C inkubiert (Gefäß abdecken!). Eine Minute mit ddH₂O waschen, dann das Gel in ein neues Gefäß überführen und eine weitere Minute mit ddH₂O waschen. Zum Entwickeln wird das Wasser abgegossen und der Entwickler zugegeben. Wenn sich der Entwickler gelb verfärbt, ist die Lösung durch neuen Entwickler zu ersetzen. Ist eine ausreichend starke Färbung der Proteinbanden erreicht, wird der Entwickler entfernt und durch Zugabe der Stopp-Lösung die Reaktion beendet.

4. Proteinbestimmung

4.1. Einleitung

Eine der am häufigsten durchgeführten und wichtigsten Arbeitsoperationen im biochemischen Laboratorium ist die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Wirksamkeit eines Zellaufschlusses kann ausschließlich anhand der Proteinkonzentration im Lysat nach Abtrennung der Zelltrümmer beurteilt werden. Der Erfolg der einzelnen Schritte einer Proteinreinigung aus einem Rohextrakt kann ohne eine quantitative Proteinbestimmung nicht nachvollzogen werden. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität oder der Wechselzahl eines Enzyms ist die genaue Kenntnis der Proteinkonzentration unverzichtbar.

In den letzten Jahrzehnten wurden viele verschiedene Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration entwickelt, verfeinert und in ihrer Empfindlichkeit gesteigert. Die Entscheidung dafür, welche Methode schließlich eingesetzt wird, ist abhängig von Faktoren wie der verfügbaren Proteinmenge, dem Einsatzgebiet, der Art der Probe und den vorhandenen Gerätschaften. Die verschiedenen Methoden erlauben alle sowohl den qualitativen und quantitativen Proteinnachweis und machen sich grundsätzlich vier verschiedene Proteineigenschaften zunutze:

- Vorhandensein von Peptidbindungen
- Reaktivität von Seitenketten
- Kolloidcharakter
- Ligandenbindungsfähigkeit

In der Praxis werden am häufigsten die Methoden nach Lowry und Bradford sowie die direkte Absorptionsmessung bei 280 nm und die Biuret-Reaktion genutzt.

4.1.1. Absorptionsmessung bei im UV-Bereich

Verbindungen, die aromatische Ringsysteme enthalten, absorbieren auf Grund der leichten Anregbarkeit der π -Elektronensysteme Licht im Bereich zwischen 260 und 280 nm. Die Seitenketten von Tryptophan und Tyrosin adsorbieren stark bei 280 nm. In diesem Wellenlängenbereich tragen auch Disulfidbrücken leicht zur Absorption bei. Die Seitenkette von Phenylalanin hingegen weist – ebenso wie Nukleinsäuren, bei 280 nm fast keine Absorption auf. Somit eignet sich die Absorption bei 280 nm gut zum qualitativen Nachweis von Proteinen (z.B. bei Durchflussspektrometern in Chromatographieanlagen). Eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration

von Proteingemischen ist mit dieser Methode fast nicht möglich, da die Absorption eines Proteins bei 280 nm von dem Tyrosin- und Tryptophangehalt des Proteins abhängt und der Extinktionskoeffizient von verschiedenen Proteinen sehr unterschiedlich sein kann. Beispielsweise kann die Absorption einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml zwischen 0 und 4 liegen, abhängig davon, wie viele Tryptophan und Tyrosin-Seitenketten vorhanden sind.

Im Fall von reinen Proteinpräparationen hingegen erlaubt diese Methode eine einfache und schnelle Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon_{280} \cdot d} \quad (6)$$

wobei c der Konzentration [M], A_{280} der Absorption bei 280 nm, ϵ_{280} dem molaren Extinktionskoeffizienten ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bei 280 nm und d der Schichtdicke der Küvette [cm] entsprechen. Um eine genaue Aussage über die Konzentration eines Proteins machen zu können, ist nach Gleichung 1 die Kenntnis des Extinktionskoeffizienten nötig. Dieser kann bei Kenntnis der Anzahl (n) von im Protein enthaltenen Tyrosin- und Tryptophanreste folgendermaßen in guter Näherung berechnet werden:

$$\epsilon_{280} [M^{-1} \text{ cm}^{-1}] = 5500 \cdot n_{Trp} + 1490 \cdot n_{Tyr} + 125 \cdot n_{Disulfid} \quad (7)$$

Eine weitere Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung von Proteinen besteht in der Messung der Absorption der Peptidbindungen. Diese haben ihr Absorptionsmaximum bei 192 nm. Die meisten UV-Spektrometer haben in diesem Wellenlängenbereich jedoch nur eine geringe Leistung und die Absorption von Sauerstoff beeinträchtigt die Messung. Aus diesem Grund wird die Absorption gewöhnlich bei 205 nm bestimmt. Bei 205 nm absorbieren neben den Peptidbindungen auch noch einige Aminosäure-Seitenketten (Trp, Phe, Tyr, His, Cys, Met und Arg), sodass es auch bei dieser Methode zu Schwankungen kommen kann. Dennoch kann die Proteinkonzentration sehr genau und fast unabhängig von der Proteinzusammensetzung bestimmt werden. Ein besonderes Problem der Absorptionsmessung bei 205 nm ist die Tatsache, dass viele Puffersubstanzen in diesem Wellenlängenbereich stark absorbieren und somit eine sehr sorgfältige Kalibrierung des Spektrometers sowie eine bedachte Auswahl der Puffer nötig sind. Oft wird auch die Absorption im Bereich um 230 nm bestimmt. In diesem Bereich tragen die Peptidbindungen auch zur Absorption bei. Aber Saccharide, Peptide und phenolische Verbindungen absorbieren in diesem Bereich ebenso und können so das Ergebnis verfälschen.

4.1.2. Biuret-Reaktion

Der Nachweis ist nach der organischen Verbindung Biuret ($\text{H}_2\text{N-CO-NH-CO-NH}_2$) benannt. Diese Verbindung bildet, genauso wie die Peptidbindungen von Proteinen, in alkalischer Lösung unter Zugabe von Wein- oder Zitronensäure mit Cu^{2+} -Ionen einen rot-bis blauvioletten Komplex (**Abbildung 10**). Dieser kann photometrisch bei 540 nm nachgewiesen werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass beim Einsatz verschiedener

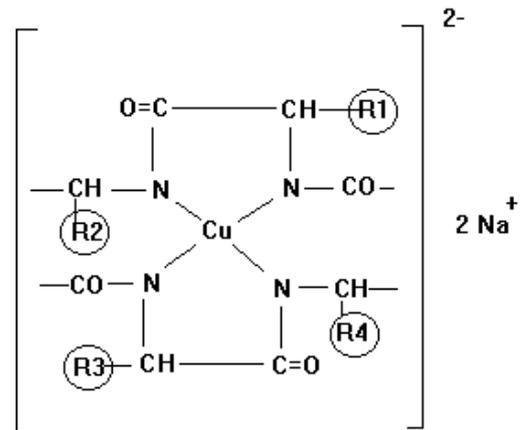


Abbildung 10 Schematische Darstellung des bei der Biuret-Reaktion gebildeten Kupferkomplexes

Proteine nur geringe Schwankungen in der Farbintensität auftreten. Darüber hinaus ist diese Methode sehr spezifisch für Proteine und Peptide. Nachteilig wirkt sich allerdings die geringe Empfindlichkeit der Reaktion aus; es werden 1 – 10 mg Protein benötigt. Störend bei der Biuret-Reaktion sind Ammonium-Ionen, die einen tiefblauen Cu-Tetramin-Komplex bilden. Es wird eine Eichgerade mit Hilfe eines Proteins bekannter Konzentration erstellt und der Absorptionswert der zu untersuchenden Probe wird mit der Eichkurve verglichen und daraus die Konzentration bestimmt.

4.1.3. Lowry-Methode

Die Lowry-Methode gliedert sich in zwei Schritte. Im ersten Schritt werden mit dem Protein und Cu^{2+} -Ionen Biuret-Komplexe gebildet. Im zweiten Schritt reduziert dieser Komplex das Folin-Ciocalteu-Reagenz. Das Folin-Ciocalteu-Reagenz enthält sechswertiges Molybdän als Heteropolysäure. Das Molybdän wird durch den Biuret-Komplex zu vierwertigem Molybdän reduziert. Dabei entsteht Molybdänblau, ein kolloidal gelöstes Mischoxid, das photometrisch bestimmt werden kann.

Diese Methode ist im Vergleich zur Biuret-Methode wesentlich empfindlicher (5 – 50 μg). Nachteilig ist hingegen die extreme Störanfälligkeit. Neben Verbindungen, die Aminogruppen enthalten und somit einen Biuret-ähnlichen Komplex bilden können, stören auch alle reduzierenden Substanzen wie z.B. phenolische Hydroxylgruppen. Somit ist die Wahl der Puffersubstanzen sorgfältig zu treffen. Darüber hinaus stören auch Komplexbildner wie EDTA, Detergenzien wie SDS und Triton, Polysaccharide, Lipide und viele anorganische Salze. Somit ist auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eher schlecht. Auch bei dieser Methode ist die Erstellung einer Eichkurve erforderlich.

4.1.4. Bradford-Methode

Die Bradford-Methode beruht, wie die Färbung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel, auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-250 (**Abbildung 11**) an basische (vor allem Arginin-) Seitenketten der Proteine. Bei der Bindung ändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs, wobei

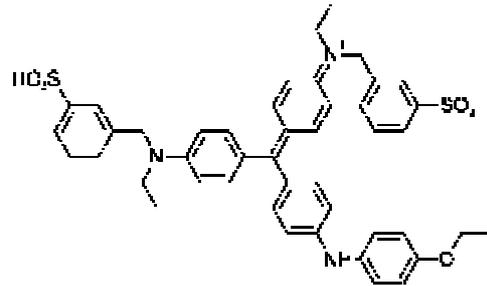


Abbildung 11 Strukturformel von Coomassie Brilliant Blau

das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Somit ändert sich die Farbe von rot-braun hin zu blau. Die Empfindlichkeit der Methode ist mit der des Lowry-Tests vergleichbar. Substanzen, die die Folin-Reaktion beim Lowry-Test stören, haben keinen Einfluss auf den Bradford-Test. Detergenzien und einige Neutralsalze wie Ammoniumsulfat hingegen stören die Nachweisreaktion. Der größte Nachteil der Methode sind allerdings die unterschiedlichen Extinktionen verschiedener Proteine bei gleicher Konzentration. Dies ist auf die Bindung von Coomassie an basische Seitenketten zurückzuführen. Somit hat bei dieser Methode die Zusammensetzung der Proteine einen großen Einfluss. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration bei Proteingemischen muss auf Standardproteine als Referenz zur Erstellung der Eichgerade zurückgegriffen werden.

4.1.5. Vergleich der verschiedenen Methoden

Tabelle 4 zeigt einen Vergleich der verschiedenen Methoden für die Proteinbestimmung. In allen Fällen wurde die gleiche Proteinmenge eingesetzt und auf das Signal von BSA normiert. Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass bei allen Verfahren z.T. starke Schwankungen auftreten. Diese sind auf die unterschiedlichen Anteile der einzelnen Aminosäuren in den Proteinen zurückzuführen.

In der Praxis wird bei isolierten Proteinen meist die Absorptionsmessung bei 280 nm angewandt, da der Extinktionskoeffizient berechnet werden kann und somit eine schnelle und einfache Konzentrationsbestimmung möglich ist. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von Gemischen hingegen eignen sich colorimetrische Methoden wie der Lowry- oder Bradford-Test besser. Welche Methode zur Anwendung kommt ist jedoch immer von der Probe und deren Eigenschaften abhängig.

Tabelle 4 Vergleich der relativen Signale verschiedener Proteine bei Verwendung unterschiedlicher Quantifizierungsmethoden*

Protein	Lowry	Bradford	UV Absorption (nm)		
			280	224-236	205
Bovine serum albumin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Chymotrypsinogen A	1.52	0.58	2.89	1.51	1.14
Trypsin	1.34	0.34	1.89	1.34	1.07
Soybean trypsin inhibitor	0.83	0.66	1.04	0.93	1.00
γ-Globulin	1.07	0.46	1.51	0.98	1.04
Cytochrome c	1.39	1.20	2.28	1.07	1.14
Ovalbumin	0.93	0.52	0.88	0.83	0.98
Myoglobin	0.84	1.38	3.07	1.47	1.16
Ribonuclease A	1.28	0.68	0.84	0.76	0.99
Lysozyme	1.54	1.00	4.19	2.09	1.23
Protamine sulfate	0.90	2.15	0.02	0.41	0.91

*Die Signale wurden auf das von BSA normiert. Für den Lowry- und den Bradford-Test wurden Dreifachbestimmungen mit 25 µg Protein durchgeführt. Die Absorptionswerte für die UV-Methode wurden durch 4-5 Messungen bei Proteinkonzentrationen zwischen 25µg/ml und 1 mg/ml ermittelt.

4.2. Problemstellung

Mit Hilfe des Bradford-Tests soll die Konzentration einer Proteinlösung bestimmt werden. Eine Eichgerade ist für einen geeigneten Bereich zu erstellen und die unbekannte Proteinprobe geeignet zu verdünnen.

4.3. Materialien

Puffer: PBS
 BSA-Stammlösung: 1 mg/ml BSA in PBS
 Reagenz: Bradford-Reagenz (Coomassie Brilliant Blau in M Phosphorsäure)
 Geräte und Zubehör: Photometer und Mikrotiterplatten

4.4. Versuchsdurchführung

Die Ansätze für die Eichkurve und die unbekannte Proteinprobe werden nacheinander in eine 96 well Platte pipettiert. Zum pipettieren der Lösungen wird immer die gleiche Pipette verwendet! Jeder Wert wird doppelt bestimmt.

Die Ansätze für die Eichkurve werden anhand von Tabelle 5 pipettiert. Alle Stammlösungen (SL1-SL6) werden bereitgestellt. Die Stammlösungen werden von oben nach unten (well A-F) in die jeweiligen wells von 2 benachbarte Reihen gegeben (siehe Pipettierschema in Tabelle 6)!

Tabelle 5 Schema einer Mikrotiter-Platte

96 well Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tabelle 6 Pipettierschema für die Mikrotiterplatte

96 well Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SL1	SL1										
B	SL2	SL2										
C	SL3	SL3										
D	SL4	SL4										
E	SL5	SL5										
F	SL6	SL6										
G	P1	P1										
H	P2	P2										

Tabelle 7 Konzentrationen der Kalibrierproben

well	µl BSA-Lösung	Konzentration [mg/ml]
A1/A2	5 µl SL 1	1,4
B1/B2	5 µl SL2	0,7
C1/C2	5 µl SL3	0,35
D1/D2	5 µl SL4	0,175
E1/E2	5 µl SL5	0,088
F1/F2	5 µl SL6	0

Die Proben unbekannter Proteinkonzentration (wird vom Betreuer bereitgestellt) werden in die noch freien wells unterhalb der Kalibrierproben (well G-H) pipettiert.

Tabelle 8 Pipettierschema für die Ansätze zur Bestimmung der Konzentration einer unbekannt Probe

well	Proben-Nr.	Volumen (µl) unbekannte Probe
G1/G2	1	5
H1/H2	2	5

Nach dem Ansatz der Kalibriergerade und der Zugaben von 5 μ l der Probe mit unbekanntem Proteingehalt wird 250 μ l Bradford-Reagenz in alle Wells gegeben und die Platte gründlich 30 Sekunden leicht geschüttelt. Nach 5 Minuten Inkubation der Proben bei Raumtemperatur (spätestens nach 60 Minuten) wird die Platte mit einem Photometer bei 590 nm ausgemessen.

Von jeder Doppelbestimmung werden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und auf Millimeterpapier aufgetragen. Später werden die Werte in Excel eingetragen und eine Standard-Gerade erstellt, wobei eine Geradengleichung ermittelt wird.

Anhand der Geradengleichung kann die Konzentration der unbekanntes Probe ermittelt werden, die im Protokoll angegeben wird.

5. Enzymkinetik

5.1. Einleitung

Enzyme sind Biokatalysatoren, die in der Lage sind, die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen durch Herabsetzung der Aktivierungsenergie zu erhöhen. Dabei wird lediglich die Einstellung des Gleichgewichtes beschleunigt. Die Lage des Gleichgewichtes wird nicht verändert! Im Vergleich zu einer unkatalysierten Reaktion laufen enzymkatalysierte Reaktionen um den Faktor $10^7 - 10^{14}$ schneller ab. Somit können die katalysierten Reaktionen unter physiologischen Bedingungen ablaufen, was bei den unkatalysierten Reaktionen meist nicht der Fall wäre. Die Enzyme erreichen dies durch Schaffung des benötigten Milieus. Die Enzyme stellen die benötigten katalytischen Gruppen in der richtigen räumlichen Anordnung bereit und sind auch in der Lage, die Reaktion in hydrophilen oder hydrophoben Umgebungen ablaufen zu lassen.

Neben der hohen Effektivität von Enzymen weisen sie auch eine enorme Substrat- und Reaktionsspezifität auf. Enzyme sind in der Regel nur in der Lage, einen bestimmten Reaktionstyp zu katalysieren, was an der Anordnung der katalytischen Reste im aktiven Zentrum liegt. Darüber hinaus kann diese Reaktion nur mit einigen wenigen Substraten durchgeführt werden. Das Enzym stellt für das Substrat eine Bindungsstelle bereit. An diese können nur das Substrat und strukturell sehr ähnliche Moleküle binden. Andere Moleküle, die u.U. die gleiche funktionelle Gruppe aufweisen, können nicht an die Substratbindungsstelle binden und somit kann die funktionelle Gruppe nicht das aktive Zentrum erreichen. Eine weitere Eigenschaft von Enzymen ist ihre Regulierbarkeit. Im Gegensatz zu anderen Katalysatoren, kann die Aktivität von Enzymen beeinflusst werden. So können Enzyme in der Zelle vorhanden sein, doch erst in bestimmten Situationen aktiviert werden. Andererseits kann die Aktivität auch herunterreguliert werden. Zur Regulation der Enzymaktivität gibt es normalerweise einen oder mehrere Mechanismen, die es erlauben, die Aktivität eines Enzyms genau an die Bedürfnisse der Zelle anzupassen. Fehler in diesen Regulationsmechanismen können ursächlich für Krankheiten sein.

In den letzten Jahrzehnten wurde viel Arbeit in die Isolierung und Charakterisierung von Enzymen, die in Stoffwechselprozesse involviert sind, investiert. Diese Arbeiten erlauben einen tiefen Einblick in den Ablauf von Stoffwechselprozessen und den Verlauf von Krankheiten. Auch die Industrie hat in der Zwischenzeit das Potential von

Enzymen für ihre Zwecke entdeckt. Insbesondere werden Enzyme eingesetzt, um umweltfreundlichere und energiesparende Prozesse zu verwirklichen. Dabei begnügt sich die Industrie mittlerweile nicht nur damit, die vorhandenen Enzyme einzusetzen, sondern arbeitet auch daran, die Substratspezifität und auch die Stabilität von Enzymen zu verändern. Mit diesen Enzymen können dann Reaktionen durchgeführt werden, die so in der Natur nicht auftreten oder die Reaktionen können mit höherer Effizienz unter anderen Bedingungen durchgeführt werden (Lösungsmittel, Temperatur, Ionenstärke...; Beispiel: Waschpulver).

Die Alkohol-Dehydrogenase ist ein sehr weit verbreitetes Enzym und gehört zu den Oxidoreduktasen. Es kommt in Bakterien, Hefen, Pflanzen und in der Leber von Tieren vor. Alle diese Enzyme katalysieren die gleiche Reaktion, doch können sie sich in Aufbau und Reaktionsmechanismus unterscheiden. Industriell ist vor allem die Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe bei der alkoholischen Gärung von Interesse.

Alkohol-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von primären Alkoholen zu Aldehyden:

$$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH}/\text{H}^+$$

Die Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe kann aber auch Isopropanol zu Isopropanon umsetzen. Diese Reaktion verläuft allerdings sehr langsam ab. Höhere sekundäre und tertiäre Alkohole werden hingegen nicht umgesetzt.

Zwischen 20 und 25 °C und bei einem pH zwischen 8,6 und 9,0 liegen die optimalen Bedingungen für die Oxidation von Alkoholen vor. Bei einem pH von 7,0 sind die Bedingungen für die Rückreaktion, also die Reduktion von Aldehyden, optimal.

Für die Dehydrierungsreaktion benötigt die Alkohol-Dehydrogenase den Kofaktor Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+), der in seine reduzierte Form NADH/H^+ umgesetzt wird. Um die Umsetzung von Ethanol zu Ethanal verfolgen zu können, wird eine Sonde benötigt. Da die Umsetzung von Ethanol zu Ethanal strikt an die Reduktion von NAD^+ gekoppelt ist, können bei dieser Reaktion die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften von NAD^+ und NADH/H^+ ausgenutzt werden (Abbildung 12). Somit kann aus der Absorptionsänderung bei 340 nm während der Reaktion auf den Umsatz von Ethanol geschlossen werden. Diese Sonde kann universell bei allen Oxidoreduktasen genutzt werden.

5.2. Problemstellung

Durch Variation der Substratkonzentration soll die Michaelis-Menten-Konstante K_M der ADH mittels eines einfachen optischen Tests ermittelt werden.

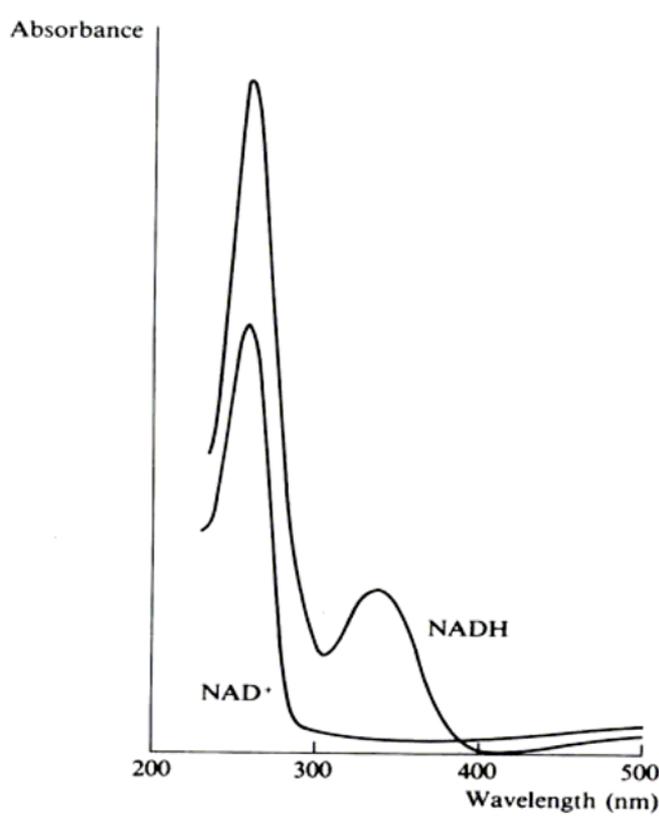


Abbildung 12 Absorptionsspektren von NAD⁺ und NADH/H⁺

5.3. Materialien

Geräte und Zubehör:	Tecan-Plattenleser (Spektrophotometer), Mikrotiterplatten, Millimeterpapier
Enzymlösung:	Ca. 0,1 mg/ml ADH in Pyrophosphatpuffer
Ethanolstammlösung:	500 mM Ethanol in ddH ₂ O
Puffer	0,1 M Natriumpyrophosphat, pH 8,8
Kofaktor-Lösung	50 mM NAD ⁺ in ddH ₂ O ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

5.4. Versuchsdurchführung

Aus der Substratstammlösung sollen durch Verdünnung mit ddH₂O 50 mM und 5 mM Ethanolösungen hergestellt werden. Die ADH-Aktivität wird dann in den folgenden Ansätzen bestimmt (Einfachbestimmungen):

Tabelle 7 Pipettierschema für die Bestimmung der ADH-Aktivität

Ansatz Nr.		1	2	3	4	5	6	7	8
NAD ⁺	µl	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
Puffer pH 8,8	µl	66	66	66	66	66	66	66	66
500 mM Ethanol		118,8	39,6	-	-	-	-	-	-
50 mM Ethanol	µl	-	-	39,6	13,2	-	-	-	-
5 mM Ethanol		-	-	-	-	66	33	24,8	19,8
ddH ₂ O (ad 2,4 µl)	µl	-	79,2	78,4	104	52,8	85,8	94,1	99
Enzymlösung (=START!)	µl	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
Substrat- konzentration [S]	mM	300	100	10	3,33	1,66	663	0,625	0,5
1/[S]	M ⁻¹	3,33	10	100	300	600	1200	1600	2000

Die im Pipettierschema aufgeführten Ansätze werden **bis auf die Enzymlösung** in eine 96well-Platte zusammenpipettiert. Mit Hilfer der Betreuer wird der Tecan Plattenleser (Spectrophotometer) eingestellt. Durch Zugabe von 6,6 µl Enzymlösung wird schließlich die Reaktion gestartet. Es muß zügig gearbeitet werden und direkt im Anschluß an das Pipettieren wird die Mikrotierplatte in den Tecan gegeben und die Extinktion bei 340 nm für 10 Minuten gemessen.

5.5. Auswertung

5.5.1. Ermittlung der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit

Die erhaltenen Messwerte werden graphisch dargestellt und aus dem linearen Bereich die initiale Reaktionsgeschwindigkeit v_0 ermittelt. Hierfür kann direkt $\Delta E_{340}/\text{min}$, das in $\Delta c/\text{min}$ umgerechnet werden kann ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), verwendet werden. Der in Versuchsreihe 1 ermittelte Wert dient dabei als Bezugswert für die Diskussion der weiteren Ergebnisse.

Tragen Sie die Reaktionsgeschwindigkeit v_0 gegen die Substratkonzentration [S] auf. Schätzen sie daraus die Michaelis-Menten-Konstante K_M ab.

5.5.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_M nach Lineweaver-Burk

Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die Beziehung zwischen dem Enzym E und dem Substrat S führt unter Annahme einiger Rahmenbedingungen zu folgender Gleichung:

$$v_{[S]} = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}} \quad (8)$$

Wobei $v_{[S]}$ die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Substratkonzentration $[S]$ angibt, v_{\max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist und K_M für die Michaelis-Menten-Konstante steht. Aus dieser Gleichung wird ersichtlich, dass die Substratkonzentration, bei der die halbe Maximalgeschwindigkeit vorliegt, K_M entspricht. Da diese Auftragung nicht linear ist, ist es schwierig, ohne großen Aufwand den K_M -Wert rein graphisch zu bestimmen. Eine lineare Auftragung würde sich zu diesem Zweck besser eignen. Gleichung 8 kann leicht in eine Form gebracht werden, die einer Geradengleichung entspricht:

$$\frac{1}{v_{[S]}} = \frac{K_M}{v_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (9)$$

Zur graphischen Ermittlung von K_M müssen lediglich die reziproken Werte der Aktivität (Geschwindigkeit) gegen die reziproken Werte der Substratkonzentration aufgetragen werden. Dies sollte im Falle einer Michaelis-Menten-Kinetik zu einer Geraden führen. Der Schnittpunkt mit der x-Achse ergibt $-1/K_M$. Der Schnittpunkt mit der y-Achse entspricht $1/v_{\max}$.

Ermitteln Sie mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Auftragung den K_M -Wert der ADH und vergleichen Sie ihn mit dem Wert, den sie zuvor bestimmt haben.

6. Anhang: Sicherheitshinweise und Regeln für das Arbeiten im Labor

- Aus Gründen der Reinheit und Arbeitssicherheit im Labor stets Kittel und geschlossenes, trittsicheres Schuhwerk sowie gegebenenfalls Handschuhe tragen! Bei chemischen Präparationen Schutzbrillen tragen! **Bitte eigenen Laborkittel mitbringen**
- Essen, Getränke und Kosmetika sind im Labor verboten.
- Für alle Arbeitsabläufe speziell beschriftete Gefäße verwenden und alle Chemikalien/Gefahrenstoffe in die dafür vorgesehenen Abfallgefäße entsorgen!
- Arbeitsplatz und Werkbank **nach** dem Experimentieren **aufräumen und säubern!** (Achtung bei aggressiven Substanzen besteht Verletzungsgefahr!)
- Ausführen von Präparationen im Labor bzw. Benutzung der Geräte erst nach detaillierter Einweisung.
- Bei eventuellen Kontaminationen der Augen oder der Haut, Augendusche bzw. Körperdusche benutzen. Die Augendusche befindet sich neben den Laborwaschbecken, die Körperdusche über der Labortür.
- Beim Ausbrechen eines Brandes in unmittelbarer Umgebung, Feuerlöscher auf dem Gang benutzen. Standort des nächsten Feuerlöschers bitte beachten. Eventuell manuell Feueralarm auslösen
- Bei Feueralarm (akustisches Signal) unverzüglich am Ausgang Budapesterstr. sammeln.
- Das Öffnen von unter Strom stehenden Elektrophoresekammern ist lebensgefährlich.
- Not-Aus-Schalter befindet sich am Eingangsbereich außerhalb des Labors
- Vor Beginn des Praktikums erfolgt noch eine praktische Belehrung vor Ort in den Laboren durch den jeweiligen Praktikumsleiter. Erst danach ist ein selbstständiges Arbeiten im Labor erlaubt.

Literaturhinweise:

- Richtlinien für Laboratorien (GUV 16.17)
- Gefahrstoffverordnung, Technische Regeln für Gefahrstoffe (TRGS)
- Verordnung über brennbare Flüssigkeiten (VbF)
- Druckbehälterverordnung, Technische Regeln für Druckbehälter und Druckgase