



Biochemische Untersuchungsmethoden, einschließlich Klinische Chemie

Wintersemester 2011/12

Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 2 -
Literatur	- 3 -
Pipettieren mit Kolbenhubpipetten, Proteinbestimmung	- 5 -
Sequenzanalyse von Proteinen (Bioinformatik)	- 7 -
Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen, SDS-PAGE	- 13 -
Identifizierung und Charakterisierung von Proteasen	- 19 -
Bestimmung kinetischer Parameter der Alkoholdehydrogenase	- 24 -
Harnuntersuchungen, Nachweis von Blut im Stuhl, Blutuntersuchungen mit Hilfe des Reflotrons, Blutdruckmessungen	29

Literatur

Alberts: Molekularbiologie der Zelle (VCH)

Bisswanger: Enzymkinetik (VCH)

Buddecke, Fischer: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Klinische Chemie (deGruyter Verlag)

Cooper, Terrance G.: Biochemische Arbeitsmethoden

Dingermann: Gentechnik Biotechnik (WVG)

Dörner: Klinische Chemie und Hämatologie (Ferdinand Enke Verlag)

Dunn: Gel Electrophoresis Proteins (BIOS scientific publishers)

Greiling, Gressner: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie (Schattauer Verlag)

Karlson: Biochemie

Knippers: Molekulare Genetik (Thieme Verlag)

Lehnninger, Nelson, Cox: Prinzipien der Biochemie (Spektrum Verlag)

Lewin: Molekularbiologie der Gene (Spektrum-Verlag)

Löffler, Petrides: Biochemie & Pathobiochemie (Springer)

Lottspeich: Bioanalytik (Spektrum Verlag)

Michael: Biochemical Pathways (Spektrum Verlag)

Müller-Esterl: Biochemie (Spektrum)

Newton, Graham: PCR (Spektrum Verlag)

Singer, Berg: Gene und Genome (Spektrum Verlag)

Stryer: Biochemie (Spektrum Verlag)

Voet, Voet: Biochemie (VCH)

Watson, Gilman, Witkowski: Rekombinierte DNA (Spektrum Verlag)

Protokolle

Zu jedem Versuch muss ein ausführliches **Protokoll** angefertigt werden!

Dieses muss beinhalten:

1. Einleitung
2. Material & Methoden
3. Ergebnisse
4. Diskussion
5. Literatur

Die Protokolle müssen am PC gefertigt und in ausgedruckter Form abgegeben werden! Protokolle in handgeschriebener Form werden in diesem Praktikum nicht bewertet. Dies dient einer möglichst realitätsgetreuen Simulation der im Laboralltag üblichen Dokumentation.

Dies bedeutet:

- a) die Einleitung nimmt eine Seite über den Versuch ein (mindestens 250 Wörter)!
- b) bei Material & Methoden kann normalerweise auf das Skript verwiesen werden, es sei denn es wurden im Versuch Änderungen durchgeführt
- c) die Ergebnisse werden aufgelistet und erläutert. Dies kann (und in manchen Fällen muss dies) mit Hilfe von Bildern bzw. Graphen dargestellt werden
- d) bei der Diskussion können die Versuche ausgewertet und einer Fehleranalyse unterzogen werden.
- e) falls Literatur hinzugezogen wurde (bei Einleitung oder Diskussion) sollte diese im Text kenntlich gemacht und dazu im Literaturverzeichnis aufgeführt werden.

Nur wenn alle Protokolle der Versuchsteilnehmer einwandfrei sind, kann ein Schein vergeben werden!

Pipettieren mit Kolbenhubpipetten, Proteinbestimmung

1. Übung zum Umgang mit Kolbenhubpipetten

Lösungen: LB-Medium

10	g/l	Pepton
5	g/l	Hefeextrakt
10	g/l	NaCl

(pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren)

Die Medien werden von den Assistenten bereitgestellt.

- a) **Jeder** Teilnehmer entnimmt aus einer mit steriles LB-Medium gefüllten Flasche steril 1 ml und überführt diese in ein 15 ml Falcon Röhrchen. Beim nächsten Pipettierschritt wird ein um 0,1 ml reduziertes Volumen steril in eben dieses Falcon Röhrchen gegeben. Diese Prozedur wird wiederholt bis insgesamt 10 Volumina – jeweils immer 0,1 ml weniger als beim vorangegangenen Pipettierschritt – in das Falcon Röhrchen gegeben wurden.
- b) Aus dem steril gefüllten 15 ml Falcon Röhrchen werden mit sterilen blauen Spitzen 10 Volumina – ausgehend von 340 µl, bei jedem Schritt 20 µl weniger – in 2 Eppendorfreaktionsgefäß („Eppis“) (beschriften und mit Kürzel versehen!) pipettiert. Schritt 1-5 in Eppi Nr. 1; Schritte 6-10 in Eppi Nr. 2.
- c) Aus Eppi Nr. 2 werden mit sterilen gelben Spitzen 10 Volumina, ausgehend von 34 µl, bei jedem Schritt 2 µl weniger, in ein Eppi pipettiert (Eppi Nr. 3; beschriften!).
- d) Aus Eppi Nr. 3 werden steril 10 Volumina, ausgehend von 3,4 µl, jeweils 0,2 µl weniger, in Eppi Nr. 4 (beschriften!) überführt.

Die Eppis werden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Morgen auf Sterilität geprüft.

2. Beimpfen der Agarplatten mit einer Bakterienkultur und Bestimmung der Zellzahl

Lösungen: LB-Medium

10	g/l	Pepton
5	g/l	Hefeextrakt
10	g/l	NaCl
15	g/l	Agar

(pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren)

Die Medien werden von den Assistenten bereitgestellt.

Einführung

Zunächst wird eine Platte entlang des Randes auf der Unterseite beschriftet (Organismus, Stamm, Plasmid, Datum, Kürzel des Experimentators). Von den zur Verfügung gestellten Bakterienkulturen werden Verdünnungsreihen in Eppendorfreaktionsgefäß in einem Gesamtvolumen von 1 ml angefertigt. Als Verdünnungsreagenz soll LB-Medium verwendet werden. Insgesamt sollen 6 Verdünnungen zu je 1:10 angefertigt werden!

Von jeder Verdünnung werden 100 µl auf eine frische LB-Platte mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert.

Die so beimpften LB-Platten werden über Nacht bei 37° Celsius inkubiert und am nächsten Tag kann anhand der Kolonienzahl auf den Platten die Zellzahl der zur Verfügung gestellten Bakterienkultur errechnet werden.

Tipp: Muss wirklich jede einzelne Kolonie gezählt werden?

3. Protokoll

Dokumentation der Kolonienzahl der einzelnen Platten und Rückschluss auf die Dichte der Ursprungssuspension!

Literatur

Beisenherz et al. (1953) Z. für Naturwissenschaften 8:555

Cooper, Terrance G.: Biochemische Arbeitsmethoden

Lottspeich, Zorbas: Bioanalytik

allg. biochemische Lehrbücher

Sequenzanalyse von Proteinen (Bioinformatik)

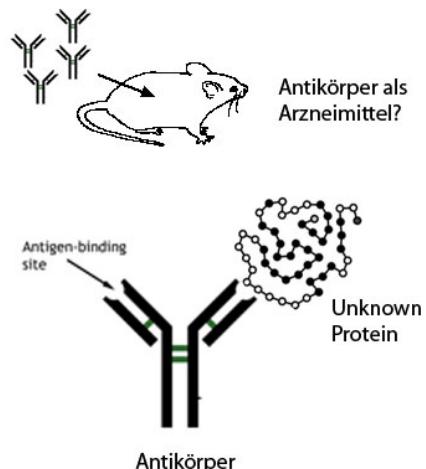
Informationen über ein bestimmtes Protein suchen

Als Wissenschaftler/in im Bereich Krebsforschung, haben Sie 1000 verschiedene Antikörper als Wirkstoffe gegen Mauskrebszellen getestet. Ein Antikörper funktioniert und verhindert Krebzellen in Zellkultur und Mäusen.

Antikörper funktionieren durch Proteinbindung. Das Protein, das vom Antikörper erkannt wird, war zunächst unbekannt, aber ein Kollege hat durch Massenspektrometrie die Proteinsequenz gefunden.

Proteine werden in Datenbanken eindeutig durch eine Accession number referenziert.

Jede Gruppe bekommt eine Accession number zugeteilt (Tabelle). Suchen Sie über die NCBI Datenbank und das Protein-Search-Feld nach Informationen über das zugehörige Protein.



Gruppe	Accession Number	Protein ?	Funktion ?
1/ 6/ 11/ 16	NP_032413		
2/ 7/ 12/ 17	P15539		
3/ 8/ 13/ 18	AAC52323		
4/ 9/ 14/ 19	NP_035300		
5/ 10/ 15/ 20	NP_598422		

Welche Informationen haben Sie über das Targetprotein gefunden?

1. Öffnen Sie die Webseite: NCBI Protein (Suchmaschine nutzen!)
2. Search-Feld **Protein**. Geben Sie die Accession number ein.
3. Der **GenPept-Report** erscheint.
 - a. Wie lautet der Name des Proteins? Finden Sie alternative Namen?

Bioinformatik

- b. Wann wurde die Sequenz des Proteins veröffentlicht oder zuletzt geändert?
 - c. Wie groß ist das Protein (Angabe in Anzahl der Aminosäuren: aa)?
 - d. Können Sie mittels des **GenPept-Report** bereits Aussagen über die Funktion des Proteins machen?

4. Erste Bioinformatik

- a. Kopieren Sie die Sequenz des Proteins in FastA Format (in NCBI Protein „FASTA“ selektieren (Oben links). Kopieren und einfügen).

Was bedeutet FastA? FastA ist ein Sequenzformat, dass viele Bioinformatik-Algorithmen akzeptiert.

Anfang des Sequenznamens, nach dem ">" -Symbol

Sequenz-Anfang nach dem ersten Absatzzeichen

Anfang des nächsten Sequenznamens, nach dem nächsten ">" -Symbol

Courier New 8 A A B I U abe x x Aa ab A

Die beste Schriftart und Größe

Ende des Sequenznamens, vor dem ersten Absatzzeichen

>NP_032413.1 · [Mus·musculus] ¶ MALWMRFLPPLLALLFLWESHTQAFVKQHLCGSHLVEALYLVCG¶ ERGFFYTPMSRREVEDPQVAQLELGGGPGAGDLQLTALAEVAQQK¶ RGIVDQCCTSICSLYQLENYCN¶ ¶ Absatzzeichen in der Sequenz

>AAC52323.1 | · [Mus·musculus] ¶ MDLSAVQIQEVQNVLHAMQKILECPICLELIKEPVSTKCDHIFCK¶ FCMLKLLNQKKGPSQCPLCKNEITKRSLQGSTRFSQLAEELLRIM¶ ¶

*Absatzzeichen (¶) bedeutet: ein normaler Zeilenumbruch, normalerweise nicht sichtbar.

- b. Ist das Protein intrazellulär?
 - Finden Sie die Webseite SignalP3.0
 - FastA sequence einfügen, analysieren.
 - c. Wo würden wir es finden?
 - Finden Sie die Webseite BaCeLo oder TargetP.
 - FastA sequence einfügen, analysieren
 - d. Molekulargewicht des Proteins (kDa)?
 - Finden Sie die Webseite „Expasy Protparam“
 - Sequenz allein einfügen (nicht FastA), analysieren
 - e. Post-Translational Modification? (z.B. glycolysieren)
 - Finden Sie „Expasy Tools“, Liste von Algorithmen
 - In „Post-translational modification prediction“ probieren Sie eine der Algorithmen aus.

Bioinformatik

Bioinformatik Hinweis:

- Kopieren Sie alle Sequenzen in einem Word-Dokument, in FastA Format (sehe unten).
- Öffnen Sie alle Fenster in einem neuen Tab.
- Lassen Sie alle Fenster gleichzeitig offen, bis das ganze Praktikum fertig ist.
- Für mehr BLAST Information, drücken sie den Fragezeichen-Button.

Der Antikörper wirkt gegen Mauskrebszellen. Wird er auch in Menschen und in Haustiere funktionieren?

Frage: Hat *Homo sapiens*, *Canis lupis* (Hund) und *Felis catus* (Katze) das Targetprotein?

Suchen Sie mittels der NCBI-BLAST-Analyse nach Homologen Ihres Proteins und fassen Sie die ersten Ergebnisse tabellarisch zusammen.

Organismus	Accession-No.	Protein	Funktion / Info	e-value
<i>H. sapiens</i>				
<i>C. lupis</i>				
<i>F. catus</i>				

1. Kopieren Sie die Sequenz des Proteins in FastA Format
2. Öffnen Sie die BLAST Seite. (Suchmaschine: „NCBI BLAST.“ Wählen Sie „Protein BLAST“.)
3. Einfügen Sie die Sequenz. Wählen Sie den Organismus aus. [nr = non-redundant, in Prinzip eine Kopie aller Gene. Es ist die größte Datenbank in NCBI]

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface. At the top, there are tabs for 'blastn', 'blastp' (which is selected), 'blastx', 'tblastn', and 'tblastx'. Below the tabs, there is a search bar labeled 'Enter Query Sequence' and another for 'Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)'. The sequence entered is: >NP_032413.1 [Mus musculus] MALWWMRFLPLLALLFLWESHTQAFVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPMSRREVEDPQVA QLELGCGPGAGDLQTLALEVAQQKRCGIVDQCCTSICSLYQLENYCN. To the right of these fields are 'Clear', 'Query subrange', 'From', and 'To' input fields. Below this, the 'Choose Search Set' section is visible, showing 'Database: Non-redundant protein sequences (nr)', 'Organism: Homo sapiens (taxid:9606)', and an 'Optional' field for 'Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.' At the bottom of the interface, there is a large blue 'BLAST' button, a note 'Search database Non-redundant protein sequences (nr) using Blastp (protein-protein BLAST)', a checked checkbox for 'Show results in a new window', and a link for 'Algorithm parameters'.

4. Drücken Sie den BLAST-Button.

Bioinformatik

5. Antworten Sie: Was bedeutet NCBI? Was bedeutet BLAST? Was bedeutet e-value? Wie würden Sie 1e-05 in NICHT-wissenschaftlicher Schrift schreiben? Welche e-value ist besser: 8e-08 oder 1e-05? Heißt query coverage „Aminosäure Identität“? In den BLAST Ergebnissen, was bedeutet Query und Sbjct (Subject)? Was bedeutet ein „+“ Leerzeichen, Buchstaben?

```
Query  14  VLHAMQKILECPICLELIKEPVSTKCDHIFCKFCMLKLLNQKKGPSQCPLCKNEITKRSL  73
       ++ +Q+ + CPICL+++++PV+ C H FC C+ ++ G +CPLCK + K ++
Sbjct   6  FVNKLQEEVICPICLIDLQKPVTIDCGHNFCLK CITQIGETSCGFFKCPLCKTSVRKNAI  65
Query  74  QGSTRFSQLAEELLRIMAA  92
       + ++ L E++ + A+
Sbjct   66 RFNSLLRNVLVEKIQALQAS  84
```

6. Klicken Sie die erste Sequenz an und suchen Sie im *GenPept-Report* nach Informationen über die Funktion der Homologen.
7. Kopieren Sie das ursprüngliche Protein plus die drei Homologen (Mensch, Hund, Katze) im „FASTA Format“ in das Programm „Notepad“ oder „Word 2007“)

Fassen Sie alle Informationen in einem selbst verfassten Text zusammen. Haben alle Organismen das entsprechende Gen? Wenn nicht, was ist mehr wahrscheinlich: dass der Organismus das Gen NICHT hat, oder dass ein Loch in der Datenbank besteht?

Literatursuche

Gibt es wissenschaftliche Publikationen mit dem unbekannten Protein als Thema?

1. Öffnen nochmal den *GenPept-Report* für das Protein
2. Finden Sie einen ansprechenden Artikel

JOURNAL	PLoS Biol. 4 (4), E86 (2006)
PUBMED	16602821
REFERENCE	5 (residues 1 to 628)
AUTHORS	Hoglund,P.J., Adzic,D., Scicluna,S.J., Lindblom,J. and Fredriksson,R.
TITLE	The repertoire of solute carriers of family 6: identification of new human and rodent genes
JOURNAL	Biochem. Biophys. Res. Commun. 336 (1), 175-189 (2005)
PUBMED	16125675
REFERENCE	6 (residues 1 to 628)
AUTHORS	Evans,J.E., Frostholm,A. and Rotter,A.
TITLE	Embrionic and postnatal expression of four gamma-aminobutyric acid

3. Öffnen Sie die Seite von Scopus (funktioniert nur von Uni-Rechnern oder über VPN-client von zu Hause)
4. Suchen Sie den Artikel!
 - a. „Add to my list,“

- b. Lesen Sie das Abstract (=Kurzzusammenfassungen, normalerweise enthält der Abstract die Fragestellung, das Ziel, Methode und die wichtigsten Ergebnisse).
- c. Schreiben Sie in Stichpunkten (oder Copy and Paste)

- i. Ziel/Fragestellung des Artikels?
- ii. Methode?

Bioinformatik

- d. Schreiben Sie ein Teil der Ergebnisse als zitierten Satz (siehe Beispiel unten).
 - e. Hat der Artikel irgendwas mit unserem unbekannten Protein zu tun?
5. Selektieren Sie den letzten Autor des Artikels (Normalerweise der Professor(in))
- a. Wieviele Veröffentlichungen, „Documents,“ finden Sie? Schauen Sie die Artikel an.
 - b. Von wann stammt die erste Veröffentlichung, von wann die letzte?
 - i. Tipp: Sort by „Date“
 - c. Welcher Artikel hat die meisten „Citations“? (wurde von anderen Artikel erwähnt/zitiert)
 - i. Tipp: Sort by Citations
 - d. Wählen Sie 2 Artikel mit >50 Citations.
 - i. „Add to my list,“ und dann von oben „My List“ selektieren
 - e. Gehen Sie zu „My List,“ wählen Sie die Artikel aus und erstellen Sie ein Literaturverzeichnis (“Create Bibliography“, „HTML“, „Harvard“)

Wichtige Tipps fürs Protokoll:

Zitieren Sie die Literaturquellen, aus welchen Sie Ihre Informationen erhalten haben, in dieser Form: (Erstautor et al., Veröffentlichungsjahr).

z.B. (auf Englisch)

The results of Liu et al. (2002) suggest that AQP7 is important for arsenite uptake into cells.

oder: AQP7 is important for arsenite uptake into cells (Liu et al. 2002).

Literaturverzeichnis Beispiel (am Ende des Protokolls):

Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J.M., Mukhopadhyay, R., Agre, P. & Rosen, B.P. 2002, "Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, no. 9, pp. 6053-6058.

Beachten Sie, dass auch Autoren verwendeter Programme zitiert werden müssen! Alle Algorithmen hier sind hoch-zitiert, und einfach mit Scopus zu finden. Suchen Sie nach der Algorithm-Name (z.B. „BLAST.“ Sort by citations. Nehmen Sie den Artikel mit den meisten Zitaten. „Add to my list.“

Sequenzvergleich

Der Antikörper bindet ~5 fortlaufende Aminosäuren in einer Proteinsequenz. Ihr Antikörper kann nur als Arzneimittel in Menschen/Hund/Katze funktionieren, wenn das homologe Protein dieser Organismen dem Protein aus der Maus ähnlich ist gegen das der Antikörper gerichtet ist

Vergleichen Sie die Sequenzen der homologen Proteine mit Ihrem Target-Protein aus der Maus!

Bioinformatik

Nutzen Sie ClustalW2 unter <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>.

Sie müssen alle 4 Sequenzen in FASTA Format einfügen.

Das Protokoll soll den Sequenzvergleich sowie eine Erklärung der Zeichen und des Farbcodes (*show colours*) enthalten. Werten Sie das Alignment in einigen Sätzen kurz aus.

Was ist die Wahrscheinlichkeit das der Antikörper eine Wirkung gegen Proteine in den anderen Tiere? Von welchem Teil des Proteins würde es binden (d.h. wo haben alle Proteine Sequenz-Identität? N-terminus? Zentrum? C-terminus?)

[Finden Sie die CLUSTALW citation in Scopus: Thompson et al. (1994) improving the sensitivity...]

Strukturanalyse

Suchen Sie mittels des Programms „Scanprosite“ nach funktionell wichtigen Bereichen in der Sequenz des Proteins. Beachten Sie, dass alle Ziffern aus der Sequenz entfernt werden müssen.

- a. Wo finden sich wichtige Bereiche im Protein? Markieren Sie diese!
- b. Welcher Teil des Proteins ist für die Funktion wichtig? Suchen Sie hierfür nach Informationen unter der angegebenen Prosite-(PS)-Nummer.

Gelelektrophoretische Trennung von Proteinen, SDS-PAGE

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die elektrophoretische Beweglichkeit (Mobilität) hängt von der Ladung und der Größe der Teilchen ab und ist somit eine substanzspezifische Größe. Die Elektrophorese kann in unterschiedlichen Medien durchgeführt werden: offenen Kapillaren, Membranen oder Gelen (Polyacrylamid, Agarose). In der Klinischen Chemie z.B. werden Elektropherogramme der Serumproteine auf Celluloseacetat-Streifen zur Erkennung von Dysproteinämien erstellt.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die im Praktikum durchgeführt wird, handelt es sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese, d.h. hier kommen Trenn- und Sammelgel zum Einsatz, die sich in Zusammensetzung und Funktion unterscheiden. Mit dieser Art der Elektrophorese erreicht man eine hohe Auflösung, schnelle Trennung und Wanderung der Teilchen in nur eine Richtung.

Um Proteine quantitativ nachzuweisen, können diese direkt im Gel angefärbt werden. Zwei häufig verwendete Methoden sind die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue und mit Silber. Die Silberfärbung ist deutlich empfindlicher und erreicht eine Nachweisgrenze im Subnanogramm-Bereich, kommt aber im Laboralltag eher selten zum Einsatz. In diesem Praktikumsversuch beschränken wir uns daher auf die gebräuchlichere Coomassie Färbung.

Zur spezifischen Analytik bestimmter Proteine werden immunologische Methoden eingesetzt. Die Verwendung von Antikörpern als analytisches Reagenz hat sich in allen Sparten der Biowissenschaften und der klinischen Diagnostik durchgesetzt, da sie sich durch hohe Spezifität in der Erkennung von Antigenen auszeichnen.

1. Gießen der Gele

Trenngelpuffer (4-fach):	18,17 g/100 ml Tris Base
	0,4 g/100 ml SDS
	0,4 g/100 ml Temed
	pH 8,8

Sammelgelpuffer (4-fach)	6,06 g/100 ml Tris Base
	0,4 g/100 ml SDS
	0,4 g/100 ml Temed
	pH 6,8

Während des Gießens der Gele werden Handschuhe (Acrylamid-Lösung) getragen.

Vor dem Gießen der Gele ist darauf zu achten, dass die Glasplatten vorher gut mit Isopropanol geputzt wurden und das die Glasplatten nach einspannen in die Gießapparatur von der unteren Kante her dicht sind (gegebenfalls mit Wasser überprüfen).

Die Gele bestehen aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Zunächst wird das Trenngel gegossen, das 12,5% Acrylamid enthält. Die erforderliche Prozentigkeit der Gele richtet sich nach dem Größenbereich der aufzutrennenden Proteine. Stellen Sie Isopropanol bereit.

Bioinformatik

Die verschiedenen Reagenzien werden unter einem Abzug in einem kleinen Becherglas vermischt und erst am Ende wird APS (Ammoniumpersulfat) hinzugegeben (Start der Polymerisation!).

SDS-Separating-Gel (Trenngel) 12,5%

Acrylamid-Gel-Solution 4,2 ml

Separating-Gel-Buffer 4x 2,5 ml

Millipore 3,2 ml

Ammoniumpersulfatsg. 10% 0,1 ml

Vor Zugabe der Ammoniumpersulfatsg. mischen!

Mit Isopropanol überschichten und aushärten lassen!

Starten Sie die Polymerisation mit 100 µl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat). Füllen Sie die Trenngellösung bis zur Markierung ein. Isopropanol wird darübergeschichtet. Die Polymerisation dauert 20-40 min.

Anschließend wird das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Dazu wird zunächst der Isopropanol abgegossen. Mit destilliertem Wasser wird reichlich nachgespült. Restliches Wasser wird mit Zellstoff abgesaugt (Gele dazu *vorsichtig* über Kopf halten). Die verschiedenen Reagenzien werden auch hier unter dem Abzug in einem Becherglas unter ständigem Rühren vermischt.

SDS-Stacking-Gel (Sammelgel)

Acrylamid-Gel-Solution 0,44 ml

Stacking-Gel-Buffer 4x 0,83 ml

Millipore 2,06 ml

Ammoniumpersulfatsg. 10% 0,02 ml

Vor Zugabe der Ammoniumpersulfatsg. mischen!

Starten Sie die Polymerisation des Sammels mit 20 µl 10% APS. Füllen Sie die Sammellösung mittels einer Pipette ein, bis die Taschen überlaufen. Achten Sie darauf, dass möglichst wenige Luftblasen in die Gele kommen. Deswegen immer einen kleinen Rest der Lösung in der Pipette lassen und nicht vollständig ausstoßen. Jetzt werden die Kämme

Bioinformatik

vollständig eingesetzt. Wenn Luftblasen entstanden sind, die Kämme auf- und abbewegen. *Es muss zügig gearbeitet werden, da die Polymerisation sehr rasch erfolgt!!!*

Der Grad der Polymerisation kann anhand der übrig gebliebenen Flüssigkeit im Becherglas beobachtet werden.

2. Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Die Probenvorbereitung wird pro Gruppe durchgeführt. Bei diesem Versuch führen Sie eine Coomassie-Färbung durch. Dazu werden sämtliche Proben auf ein Gel aufgetragen, welches nach der Elektrophorese mit der Färbemethode weiterbehandelt wird.

Auf das Gel wird BSA in unterschiedlichen Mengen, ein Marker (Gemisch aus Proteinen bekannter Größe) und Proben gereinigter Proteine aufgetragen. Da Proteinproben unterschiedlicher Größe verteilt werden soll anhand der SDS-PAGE und der Färbemethode die erhaltene Proteinprobe von ihnen bestimmt werden.

Anhand der unterschiedlichen BSA-Mengen kann nach der Färbung des Gels, die Menge der unbekannten Proteinprobe abgeschätzt werden. Der Marker dient zur Größenbestimmung der unbekannten Proteine.

Sie erhalten vom Assistenten einen BSA-Standard (100 µg/ml), einen Proteinmarker und ein gereinigtes Protein für die Coomassie-Färbung und den Probenpuffer.

Pipettieren Sie die Proben nach dem folgenden Schema zusammen:

Nr	Probe	Abkürzung	Menge	Probenpuffer (PP)
1	Marker	M	10 µl	10 µl
2	BSA 1000 ng	B	x µl BSA + y H ₂ O	10 µl
3	BSA 750 ng	B	x µl BSA + y H ₂ O	10 µl
4	BSA 400 ng	B	x µl BSA + y H ₂ O	10 µl
5	Proteinprobe	P1	10 µl	10 µl

Die Probe 1 erhalten Sie gebrauchsfertig. Pipettieren Sie die Proben nicht um, lassen Sie sie einfach in dem Gefäß, welches sie vom Assistenten erhalten haben. Sie müssen lediglich 10 µl Probenpuffer hinzugeben.

Zur Erstellung der verschiedenen BSA-Proben wird ein BSA-Standard (**100 µg/ml**) ausgegeben. Berechnen Sie das Volumen, das notwendig ist, um die oben angegebenen Absolutmengen an BSA aufzutragen. Sollten die von Ihnen berechneten BSA-Mengen zu gering sein, um sie mit den vorhandenen Pipetten pipettieren zu können, müssen Sie das BSA entsprechend verdünnen. Die Berechnung sollte vor Beginn des Praktikums erfolgen.

Bioinformatik

Besprechen Sie Ihre Ergebnisse mit dem Assistenten. Die berechneten Volumina der BSA-Lösung werden in Eppendorfcups pipettiert, das Volumen mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 10 µl Probenpuffer zugegeben.

Protokollieren Sie Ihr Pipettierschema.

Anschließend werden alle Proben 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend werden die Proben 5 sec abzentrifugiert und nach dem Pipettierschema auf dem Gel aufgetragen.

3. Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wird vertikal durchgeführt.

Der 5x Laufpuffer	15,1	g/l	Tris Base
	94	g/l	Glycin
	5	g/l	SDS (Natriumlaurylsulfat)

wird 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt (Endvolumen 500 ml). Verwenden Sie bei der Herstellung des Laufpuffers bitte nicht die Bechergläser, sondern die Messzyylinder. Es sind genug davon da. Die Bechergläser brauchen sie anschließend noch für die Färbung.

Lassen Sie sich vom Assistenten erklären, wie die Gele in der Gelkammer befestigt werden. Nach Befestigung der Gele in den Gelkammern können die Kammern der Elektrophorese-Apparatur mit Laufpuffer gefüllt werden. Der Kamm wird erst entfernt, nachdem die Kammer mit Puffer gefüllt ist.

Die Proben werden nach dem vorher besprochenen Schema in die Taschen gefüllt. Dazu verwendet man eine **20µl-Pipette**. Lassen Sie sich vom Assistenten das Auftragen zeigen. Verwenden Sie zum Auftragen immer dieselbe Pipettenspitze (mit Laufpuffer spülen). Achten Sie aber darauf, dass Sie die Proben immer sorgfältig ausstoßen.

Die Apparatur wird an die Spannungsquelle angeschlossen (Polung?). Überlegen Sie, wo sich Anode und Kathode befinden.

Die Elektrophorese erfolgt zunächst bei 100 V (Proben durchlaufen das Sammelgel), nach der Fokussierung bei 250 V. Gegen Ende der Elektrophorese bereiten Sie bitte ein Becherglas mit Coomassie-Färbelösung vor. Es werden 600 ml oder 1 l Bechergläser verwendet. Bitte decken Sie das Becherglas, in das Sie die Coomassie-Färbelösung gegossen haben, sofort mit Alufolie ab (Methanol!).

Die Elektrophorese wird beendet (Spannungsquelle ausschalten), wenn die Bromphenolblaubande aus dem Gel herausgelaufen ist.

Im Beisein des Assistenten werden die Glasplatten mit Hilfe einer Rasierklinge auseinandergehobelt (achten Sie darauf, an welcher sich das Gel befindet). Das Sammelgel wird abgeschnitten und verworfen.

4. Coomassie-Färbung

Das Gel wird 30 min im Färbebad (600 oder 1 l Becherglas) auf dem Schüttler geschwenkt. In dieser Zeit können Sie den Coomassie-Entfärbler (2 Liter: 30 % EtOH, 7,5 % Essigsäure) herstellen. Anschließend wird die Färbelösung wieder zurück ins Vorratsgefäß gegossen. Das Gel wird kurz mit wenig Wasser gespült, anschließend mit Entfärbler versetzt und wieder auf dem Schüttler geschüttelt. Beobachten Sie die Entwicklung der Banden. Der Entfärbler

Bioinformatik

wird zwischendurch mehrmals gewechselt. Sind die Kontraste stark genug, wird das Gel dokumentiert und kann ausgewertet werden. Über Nacht wird es in Wasser gelagert.

Der Coomassie-Farbstoff sollte als organische Verbindung nicht ins Abwasser gelangen. Also sammeln Sie bitte die Waschlösung bzw. den Entfärbler und geben Sie sie in die entsprechenden Abfallkanister.

Dokumentation und Auswertung

Der Assistent fertigt mit Ihnen Videoprints von den Gelen an. Beschriften Sie diese!

Anhand der Markerproteine (Molekulargewichte erfahren Sie vom Assistenten) wird eine Kalibrierkurve gezeichnet (Ig Molekulargewicht gegen R_f) und die Größe der Proteine in der Probe bestimmt. Fertigen Sie eine Wertetabelle mit der Größe der Markerproteine, M_{lg} und R_f -Werte an. Bestimmen Sie die Größe des gesuchten Proteins.

Mit Hilfe des aufgetragenen BSA-Standards wird die Menge der Proteine durch Vergleich der Farbintensität abgeschätzt.

Diskutieren Sie Ihr Ergebnis. Gehen Sie dabei auf die Nachweisgrenzen der Färbemethode ein.

5. Protokoll

Skizzieren Sie den Versuchsaufbau. Achten Sie bei der Auswertung besonders auf die Zuordnung der Markerbanden und berechnen Sie anhand der BSA Konzentrationsreihe und der Laufstrecke die Größe und die Konzentration ihrer unbekannten Proteinprobe!

Materialien / Reagenzien

Probenpuffer: 100 mM Tris/HCl pH 6,8 (pH-Wert genau einstellen)

4% SDS

0,2% Bromphenolblau

20% Glycerol

Dazu 200mM DTT (Dithiothreitol) zugeben. D.h. 30mg DTT auf 1mL Sample-Buffer geben.

Laufpuffer (5-fach): 15,1 g/l Tris Base

94 g/l Glycin

5 g/l SDS (Natriumlaurylsulfat)

Coomassie-Färbelösung: 0,2% Coomassie Brilliant Blue G-250

10% Essigsäure

Bioinformatik

50% MeOH

Entfärbet: 7,5% Essigsäure

30% EtOH

Ethanol 30 %

Essigsäure 7 %

6. Vorbereitung

Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese?

Hintergrund der einzelnen Schritte der Vorbereitung der Proben?

Welche Zusammensetzung haben die Puffer, Lösungen und Gele in diesem Versuch und welche Funktion haben ihre einzelnen Komponenten?

Acrylamid/Bisacrylamid zeichnen!

Aufbau einer Gelkammer?

Identifizierung und Charakterisierung von Proteasen

Proteasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen. Diese Enzymklasse (Hydrolasen) spielt bei vielen physiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Die Verdauung von Nahrungsproteinen erfolgt z.B. proteolytisch (Trypsin, Pepsin usw.). Für die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade sind Proteasen essentiell (z.B. Thrombin). Nach ihrem katalytischen Mechanismus unterscheidet man Serinproteasen, Metalloproteasen, Thiolproteasen und saure Proteasen (Carboxyproteasen). Viele Enzyme und Proteine werden durch Proteolyse aktiviert, so auch Proteasen selbst. Dadurch wird eine schnelle und effektive Antwort im Organismus erreicht.

Im Versuch werden die Eigenschaften von drei Proteasen (Pepsin, Trypsin, Bromelain) untersucht. Diese Peptidasen spalten Peptidbindungen innerhalb einer Kette, ihre Spezifität bezieht sich auf bestimmte Strukturmerkmale der Peptidketten. Als Substrat dient γ -Globulin. Alle Reaktionen werden durch Zugabe des Enzyms gestartet. Alle Ansätze werden während der angegebenen Reaktionszeit bei 37°C inkubiert. Trichloressigsäure (TCA) stoppt die Proteolyse. Nach 6 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, Gegengewicht nicht vergessen) werden die Überstände bei 280 nm photometrisch vermessen. Falls die Messwerte nicht wie erwartet ausfallen, kann es daran liegen, dass sich ein Teil des Bodensatzes wieder abgelöst hat. Bitte zentrifugieren Sie in diesem Fall erneut und wiederholen die Messung.

Jede Gruppe erhält eine Protease und muss diese identifizieren und charakterisieren. Die zu verwendende Enzymmenge beträgt bei allen Teilversuchen 100 µl. Richten Sie sich nach den Pipettierschemen und beachten Sie, dass alle Ansätze nach dem Start mit Enzym (kurz), und nach dem Stoppen mit TCA (gründlich) **gevortext** werden.

1. Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums wird die Reaktion der zu untersuchenden Proteasen in Puffern verschiedener pH-Werte durchgeführt. Sie verwenden denaturiertes Globulin als Substrat.

Die einzelnen Puffer sowie das denaturierte γ -Globulin wurden vom Assistenten vorbereitet: 500 mg γ -Globulin, 18 g Harnstoff, 4 ml 1 N NaOH wurden in 40 ml H₂O gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Mit HCl wurde auf pH 7,5 titriert und auf 50 ml aufgefüllt.

Für diesen Versuchsteil werden 8 Ansätze vorbereitet. Jeder Ansatz enthält 840 µl Puffer mit dem angegebenen pH-Wert, 60 µl DMSO, 200 µl denaturiertes Globulin und 100 µl Protease.

Ansatz Nr.	Null-abgleich	2	3	4	5	6	7	8
840 µl Puffer	pH 8	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
60 µl DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+
200 µl Globulin <u>denaturiert</u>	+	+	+	+	+	+	+	+

Proteasen

Nach der Zugabe des Globulins (kurz vortexen) erfolgt eine Vorinkubation bei 37°C für 5 min. (Warum)?

Dem Nullabgleich wird **vor** der Enzymzugabe TCA zugefügt. (Begründen Sie dieses Vorgehen!)

Anschließend startet man die Reaktion aller Ansätze durch Zugabe der entsprechenden Menge Enzym im Zeittakt (30 sec), vortext und inkubiert weitere 15 min bei 37°C.

Anschließend wird die Reaktion mit 100 µl TCA, ebenfalls im Zeittakt, gestoppt (außer Nullabgleich). Vergessen Sie das Vortexen nicht. Die Reaktionsansätze werden zentrifugiert und die Überstände photometrisch bei 280 nm in Quarzküvetten vermessen (warum können Sie keine Kunststoffküvetten verwenden?).

Ansatz Nr.	Null-abgleich	2	3	4	5	6	7	8
Extinktion(280 nm)	0							

Zur Auswertung wird die Extinktion gegen den pH-Wert aufgetragen. Bestimmen Sie das pH-Optimum Ihrer Protease. **Besprechen Sie mit dem Assistenten Ihr Ergebnis, bevor Sie mit Versuchsteil 2 und 3 beginnen.**

Diskutieren Sie im Protokoll, weshalb Ihre Protease dieses pH-Optimum aufweist (physiologische Funktion der Protease bedenken), überlegen Sie welches Optimum die anderen beiden Proteasen aufweisen und weshalb dieses physiologisch sinnvoll ist!

2. Zeitverlauf der Fragmentierung von nativem und denaturiertem γ-Globulin

Im Versuch wird die Proteolyse von nativem und denaturiertem γ-Globulin durch eine Protease zeitlich verfolgt. Dazu wird die Reaktion zu folgenden Zeitpunkten untersucht: 0, 2, 5, 10, 15, 20 und 30 min.

a): Für jeden Zeitpunkt wird ein Ansatz (§ 7) vorbereitet, der jeweils 840 µl Puffer, 60 µl DMSO und 200 µl *natives* γ-Globulin enthält. **Achten Sie darauf, dass Sie den Puffer verwenden, der dem pH-Optimum Ihrer Protease entspricht.**

Ansatz Nr.	0	1	2	3	4	5	6
60 µl DMSO	+	+	+	+	+	+	+
840 µl Puffer	+	+	+	+	+	+	+
200 µl Globulin	+	+	+	+	+	+	+

Man inkubiert jetzt alle Reaktionsansätze 5 min bei 37°C vor.

Dem Ansatz 0 (Nullumsatz, Inkubationszeit = 0 min) wird nun 100 µl TCA zugefügt.

Proteasen

Anschließend wird die Protease zugesetzt.

Bei allen übrigen Ansätzen wird nun die Reaktion durch Zugabe der Protease im Zeittakt von 30 sec gestartet (Vortexen!). Die Ansätze werden weiter bei 37°C inkubiert. Gestoppt wird durch Zugabe von 100 µl TCA (Vortexen!), ebenfalls im Zeittakt. Weshalb ist es sinnvoll, mit Ansatz 6 (längste Inkubationszeit) zuerst zu starten?

Ansatz Nr.	0	1	2	3	4	5	6
100 µl TCA	+	-	-	-	-	-	-
Startzeit [min:sec]	-	2:30	2:00	1:30	1:00	0:30	0
Stopzeit [min:sec]	-	4:30	7:00	11:30	16:00	20:30	30:00
Inkubationszeit [min]	0	2	5	10	15	20	30

b): Ebenso wird mit dem denaturierten γ-Globulin verfahren.

Ansatz Nr.	0	1	2	3	4	5	6
Inkubationszeit [min]	0	2	5	10	15	20	30
a) Extinktion (280 nm)							
b) Extinktion (280 nm)							

Erstellen Sie Zeit-Umsatz-Kurven für die Umsetzung des nativen und des denaturierten Globulins (Extinktion gegen Zeit) auf einem Millimeterpapier. Welcher Unterschied besteht in den Kurvenverläufen? Diskutieren Sie Ihre Ergebnisse im Protokoll!

3. Charakterisierung durch Inhibitoren

Proteasen werden durch Inhibitoren spezifisch gehemmt. Sie werden Ihr Enzym mit Hilfe der folgenden Inhibitoren untersuchen:

Trypsininhibitor (T)

EDTA (E)

Pepstatin (P)

Proteasen

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

p-Hydroxymercuribenzoat (pHMB)

P und PMSF frieren auf Eis sofort ein, bitte frühzeitig auftauen!

Achten Sie auf das pH-Optimum der zu untersuchenden Protease (Teilversuch 1).

Die Bestimmung des Nullumsatzes (Ansatz 0) und des Maximalumsatzes (Ansatz 100%) ist für die Auswertung des Versuches notwendig. Der Nullumsatz wird **vor** Enzymzugabe mit 100 µl TCA versetzt (vgl. Versuchsteil 1 und 2). Den Maximalumsatz erhält man, wenn man einem Ansatz 100 µl H₂O (statt eines Inhibitors) zusetzt.

Man startet alle Ansätze im Zeittakt (30 sec) mit der entsprechenden Menge Enzym (Vortexen!).

Die Ansätze werden 5 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend wird die Reaktion mit Enzym im Zeittakt (30 sec) gestartet. Nach 15 min Inkubation bei 37°C stoppt man die Ansätze (außer Ansatz 0) im Zeittakt mit je 100 µl Trichloressigsäure (TCA) und vortext kräftig. Die Überstände der Zentrifugation (5 min, 10 000 rpm) werden bei 280 nm vermessen.

Für alle drei Proteasen wird nach dieser Vorschrift verfahren.

Ansatz Nr.	100%	1	2	3	4	5	0
60 µl DMSO	+	+	+	+	+	+	+
100 µl H ₂ O oder Inhibitor	H ₂ O	T	EDTA	P	PMSF	pHMB	H ₂ O
840 µl Puffer	pH = entsprechend Ergebnissen Teilversuch 1						
200 µl Globulin <u>denaturiert</u>	+	+	+	+	+	+	+
100 µl TCA	-	-	-	-	-	-	+
Extinktion							

Zur Auswertung der von Ihrer Gruppe untersuchten Protease wird die Extinktion in einem Balkendiagramm aufgetragen und die prozentuale Hemmung ausgerechnet. Was ist Bezugswert (100%)? Erläutern Sie, weshalb Ihre Protease von dem jeweiligen Inhibitor gehemmt wird (Mechanismus). Diskutieren Sie im Protokoll auch die theoretischen Ergebnisse für die anderen Proteasen. Informieren Sie sich dazu über die Wirkungsweise der Inhibitoren.

Erläutern Sie in Ihrem Protokoll weiterhin:

Was passiert bei der Zugabe von TCA zu Ihrem Reaktionsansatz?

Proteasen

Aufgrund welcher Eigenschaft kann der Überstand der Reaktionslösung bei 280 nm vermessen werden?

Warum denaturiert γ -Globulin unter den angegebenen Bedingungen?

Materialien / Reagenzien

Puffer pH 2:	25 ml 0,2 M KCl + 6,5 ml 0,2 N HCl; H ₂ O ad 100 ml
Puffer pH 3	25 ml 0,2 M Glycin + 5,7 ml 0,2 N HCl; H ₂ O ad 100 ml
Puffer pH 4:	18 ml 0,2 M NaAc + 82 ml 0,2 M Essigsäure
Puffer pH 5:	70 ml 0,2 M NaAc + 30 ml 0,2 M Essigsäure
Puffer pH 6:	50 ml 0,1 M KH ₂ PO ₄ + 5,6 ml 0,1 N NaOH; H ₂ O ad 100 ml
Puffer pH 7:	50 ml 0,1 M KH ₂ PO ₄ + 29,1 ml 0,1 N NaOH; H ₂ O ad 100 ml
Puffer pH 8:	50 ml 0,1 M KH ₂ PO ₄ + 46,1 ml 0,1 N NaOH; H ₂ O ad 100 ml
TCA:	80% TCA (w/v)
Trypsininhibitor:	0,1 mg/ml in H ₂ O
EDTA:	140 mM in H ₂ O, pH 7,0
Pepstatin:	2 mg in 10 ml DMSO
PMSF:	100 mM in DMSO
p-Hydroxymercuribenzoat:	14 mM in H ₂ O

Fragen

Bitte informieren Sie sich vor dem Praktikum über die Theorie der Versuche!

Vorausgesetzt werden außerdem der Inhalt der Vorlesung zum Versuch sowie das Wissen über alle vorangegangenen Versuche!

Wie unterscheiden sich Exo- und Endopeptidasen?

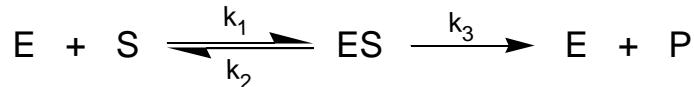
Worauf beruht die spezifische Wirkung der im Versuch verwendeten Proteaseinhibitoren?

Informieren Sie sich über die Anwendung von Proteaseinhibitoren bei der Behandlung von AIDS.

Vorausgesetzt werden Kenntnisse über den Reaktionsmechanismus der einzelnen Proteaseklassen.

Bestimmung kinetischer Parameter der Alkoholdehydrogenase

Enzyme sind Katalysatoren biologischer Systeme und beschleunigen Reaktionen mindestens um den Faktor 10^6 . Enzyme sind hochspezifisch, was die zu katalysierende Reaktion und das Substrat betrifft. Das Michaelis-Menten-Modell ist das einfachste Modell, mit dem die kinetischen Eigenschaften vieler Enzyme erklärt werden können. Dabei wird folgende Reaktionsgleichung zugrunde gelegt:



Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v von der Substratkonzentration $[S]$ wird durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben:

$$v = v_{\text{Max}} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Im Praktikumsversuch werden kinetische Parameter der Alkoholdehydrogenase (ADH) untersucht. Dieses Enzym katalysiert die Dehydrierung von Ethanol zu Acetaldehyd, dabei fungiert NAD^+ als Cosubstrat. Da diese Reaktion eine Zwei-Substrat-Reaktion ist, gilt folgende Gleichung:

$$v = \frac{v_{\text{max}}}{1 + \frac{(K_M)s_1}{[s_1]} + \frac{(K_M)s_2}{[s_2]} + \frac{(K_M)s_1 s_2}{[s_1] * [s_2]}}$$

Wählt man nun die Konzentration $[s_2]$ wesentlich höher als $K_M s_2$ (Reaktion Pseudo-1. Ordnung), so ergibt sich folgende Gleichung, die formal der Ein-Substrat-Reaktion entspricht:

$$v = v_{\text{max}} \frac{[s_1]}{(K_M)s_1 + [s_1]}$$

Dadurch lässt sich K_M für ein Substrat bestimmen. Wählt man nun die Konzentration des anderen Substrats wesentlich höher als K_M , lässt sich K_M für s_2 bestimmen.

Vorbereitung

- allgemeine Eigenschaften von Enzymen, Enzymkinetik
- das Michaelis-Menten-Modell
- Definition und Bedeutung von K_M , v_{max} , Wechselzahl und Aktivität
- die Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk (LB), Eadie-Hofstee (EH) und Hanes-Woolf (HW)
- Wie wird v aus den erhaltenen Graphen bestimmt?
- $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ (Strukturformel, reaktiver Bereich)
- Reaktionsgleichungen aller ablaufenden Reaktionen
- Warum wird dem Reaktionsansatz Semicarbazid zugefügt?
- Warum muss $\Delta E/\text{min}$ aus dem linearen Teil der Zeit-Umsatz-Kurve bestimmt werden?

Versuchsvorbereitung

Bereiten Sie eine Wertetabelle vor, um 10 Zeit-Umsatz-Kurven (2 Messreihen mit 5 Zeit-Umsatz-Kurven) über einen Zeitraum von 5 min (Ablesetakt 15 sec) aufzunehmen.

Holen Sie Eis, da sämtliche Lösungen während des Versuchs auf Eis gelagert werden müssen. Sie erhalten vom Assistenten folgende Lösungen:

Glutathion-Lösung (G) [300mM]

Semicarbazid-Lösung (S) [2,2M]

Glycin-Natriumpyrophosphat-Puffer pH 9 [75 mM]

ADH (ADH) aktuelle Konzentration wird am Versuchstag bekannt gegeben

NAD⁺-Lösungen in folgender Verdünnung:

Lösung 1: 0,0587 M NAD⁺

Lösung 2: 5,00 ml Lösung 1 ad 10,00 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

Lösung 3: 2,50 ml Lösung 2 ad 10,00 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

Lösung 4: 4,00 ml Lösung 3 ad 10,00 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

Lösung 5: 5,00 ml Lösung 4 ad 10,00 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

Ethanol-Lösungen in folgender Verdünnung:

Lösung A: 16,88 M **Ethanol**

Lösung B: 1,00 ml Lösung A ad 10,00 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

Lösung C: 2,00 ml Lösung B ad 10,00 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

Lösung D: 1,00 ml Lösung B ad 10,00 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

Lösung E: 0,50 ml Lösung B ad 10,00 ml mit bidest. H₂O aufgefüllt

Um genügend Material für alle nötigen Versuchsreihen parat zu haben, pipettieren Sie bitte pro Gruppe folgende Mengen der Versuchslösungen in je ein 1,5 ml Eppendorfcup und stellen Sie sich die Lösungen auf Eis bereit:

ADH: 200µl

S: 1000µl

G 1000µl

Ethanol: NAD⁺-Lösung:

A: **600**µl 1: 210µl

B: 110µl 2: **1200**µl

C: 110µl 3: 210µl

D: 110µl 4: 210µl

E: 110µl 5: 210µl

Versuchsdurchführung:

Messreihe 1:

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter für ADH bezüglich EtOH, K_m EtOH, unter den vereinfachenden Bedingungen einer Ein-Substrat-Reaktion werden die Ethanol-Lösungen A bis E jeweils mit 200 µl der NAD⁺-Lösung 2 vermessen und die Ergebnisse in die vorbereitete Tabelle eingetragen. Die NAD⁺ Konzentration bleibt also konstant!!

Messreihe 2:

Zur Bestimmung der Michaeliskonstanten für ADH bezüglich NAD⁺, K_m NAD⁺, unter den vereinfachenden Bedingungen einer Ein-Substrat-Reaktion werden die NAD⁺-Lösungen 1 bis 5 jeweils mit 100 µl der Ethanol-Lösung **A** vermessen und die Ergebnisse in die Tabelle eingetragen. Die Ethanol Konzentration bleibt also konstant!!

Pipettieren Sie in eine Makroküvette pro Versuchsreihe:

2,5 ml Glycin-Natriumpyrophosphat-Puffer

100 µl Semicarbazid-Lösung

100 µl Glutathion-Lösung

100 µl der jeweiligen Ethanol-Lösung

200 µl der jeweiligen NAD⁺-Lösung

Mischen Sie gut durch. Gleichen Sie mit dieser Lösung (ohne Zugabe von ADH) das Photometer bei 340 nm gegen Null ab. Kontrollieren Sie die Absorption (muss konstant werden).

Starten Sie jetzt die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **20 µl ADH-Lösung** (gut mischen, aber zügig arbeiten) und tabellieren Sie die Extinktionsänderung über 5 min alle 15 sec. Brechen Sie die Messreihe ab, sobald die Absorption über 1,0 gestiegen ist.

Spülen Sie die Küvette nach jeder Messreihe mit Wasser und führen Sie vor jeder neuen Messreihe einen Nullabgleich durch.

Auswertung

Nachdem Sie die Messung durchgeführt haben, beginnt mit der Auswertung Ihrer Werte der eigentlich interessante Teil des Versuchs. Sie werden sehen, wie Sie mit Hilfe der Messwerte ein Michaelis-Menten-Diagramm erstellen können. Sie werden ebenfalls die verschiedenen Linearisierungsverfahren kennen lernen und dann in der Lage sein, die charakterisierenden Enzymparameter wie v_{max}, K_M, die Wechselzahl und die Aktivität für das betrachtete Enzym zu bestimmen.

Tragen Sie die von Ihnen gemessenen Extinktionen gegen die Zeit (in min) auf (10 Kurven) und bestimmen Sie graphisch die Steigung ($\Delta E/min$) aus dem linearen Bereich der Zeit-Umsatz-Kurven. Zeichnen Sie die Kurven auf Millimeterpapier.

Mit Hilfe der aus den Graphen bestimmten Steigungen und dem Lambert-Beer'schen Gesetz ($\text{NADH } \epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,2 * 10^3 \text{ cm}^3/\text{mmol} \cdot \text{cm}$) können Sie die Reaktionsgeschwindigkeit v für jede

der 10 Messungen berechnen. Achten Sie beim Rechnen auf das richtige Kürzen der Einheiten.

Berechnen Sie die Konzentrationen der eingesetzten Stammlösungen $[s_0]$ und die daraus resultierenden Konzentrationen $[s]$ im Test.

Erstellen Sie mit Hilfe der Werte die entsprechenden Diagramme.

Bestimmen Sie sowohl aus den Michaelis-Menten-Diagrammen als auch aus den linearisierten Diagrammen K_M und v_{max} .

Protokoll

- Fertigen Sie das Protokoll inklusive der Diagramme **handschriftlich** an!
- Geben Sie für die Berechnung der Verdünnungen $[s_0]$ und der Testkonzentration $[s]$ jeweils eine Beispielrechnung an.
- Geben Sie die für die Berechnung von v nötigen Zusammenhänge und eine Beispielrechnung an.
- Erstellen Sie mit Hilfe der Werte sowohl für NAD^+ als auch für Ethanol die entsprechenden Diagramme nach Michaelis & Menten, Lineweaver & Burk, Eadie & Hofstee, Hanes & Woolf und bestimmen Sie jeweils K_M und v_{max} .
- Achten Sie auf die korrekte Achsenbeschriftung der Diagramme.
- Geben Sie in den Diagrammen an, wo Ihre Werte abgelesen wurden und wie Sie die Werte berechnet haben, wenn diese nicht direkt ablesbar waren (Einheiten nicht vergessen).
- Bilden Sie jeweils den Mittelwert aus den jeweils 4 ermittelten K_M und v_{max} Werten und berechnen Sie daraus die **Aktivität** der ADH, bezogen auf 1 mg Protein (U/mg) und die **Wechselzahl** der ADH (Molekulargewicht 110.000 g/mol). Beachten Sie auch hier die im Versuch verwendete Verdünnung des Enzyms. Die Konzentration der ADH-Lösung wird Ihnen am Versuchstag vom Assistenten mitgeteilt.

Definieren Sie kurz die Begriffe Wechselzahl und Aktivität und diskutieren Sie Ihre erhaltenen Werte (K_M , v_{max} , Wechselzahl, Aktivität) in Bezug auf Unterschiede zwischen NAD^+ und EtOH, die Bedeutung hoher bzw. niedriger Werte und die physiologischen Bedingungen.

Harnuntersuchungen, Nachweis von Blut im Stuhl, Blutuntersuchungen mit Hilfe des Reflotrons, Blutdruckmessungen

Über die Urinkonzentration geeigneter Parameter kann die Stoffwechselleistung der Niere beurteilt werden. Die Niere ist das wichtigste Organ zur Homöostase des Wasser-, des Elektrolyt- und des Säuren-Basen-Haushaltes. Außerdem werden über die Niere stickstoffhaltige Metabolite des Proteinstoffwechsels ausgeschieden. Harn als Untersuchungsmaterial hat den Vorteil, dass er in ausreichender Menge und ohne Belastung des Patienten gewonnen werden kann.

In den vergangenen Jahren hat sich die Teststreifenanalytik des Urins durchgesetzt, da sie eine bessere Praktikabilität, eine höhere Spezifität und eine zuverlässiger halbquantitative Konzentrationsbestimmung gegenüber den nasschemischen Bestimmungen aufweist. Die für die Bestimmung benötigten Chemikalien befinden sich in dem saugfähigen Material der Testfelder. Sie lösen sich, wenn der Teststreifen mit Urin benetzt wird und können mit den im Urin enthaltenen Substraten (nachzuweisende Parameter) reagieren.

1. Harnuntersuchungen mittels Teststreifen

Bereits mit handelsüblichen Teststreifen (z.B. Combur-Teststreifen) lassen sich eine Vielzahl verschiedener Parameter im Urin zuverlässig bestimmen. So lassen sich insbesondere bakterielle Harnwegsinfekte oder bestimmte Stoffwechselerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Phenylketonurie) diagnostizieren. Es ist jedoch zu beachten, dass eine alleinige Diagnose aufgrund eines positiven Teststreifenbefundes nicht möglich ist.

Hinweise zu den einzelnen Tests

Nitrit

Physiologischer Harn ist normalerweise keimfrei. Bei bakteriellen Harnwegsinfektionen können jedoch bestimmte Bakterien das im Harn vorhandene Nitrat zu Nitrit reduzieren. Ein positiver Nitrit-Nachweis zeigt somit einen bakteriellen Harnwegsinfekt an. Da jedoch nicht alle Bakterien Nitrat zu Nitrit reduzieren können, fällt der Test u.U. falsch negativ aus.

Der Nachweis beruht auf der Bildung eines rot gefärbten Azofarbstoffes. Das Nitrit wird in ein Diazoniumion umgewandelt, welches Sulfanilsäure diazotiert. Anschließend erfolgt eine Kopplung mit einem Naphthalin-Derivat.

Eiweiß

Urin enthält normalerweise keine Proteine. Eine Proteinurie kann jedoch bei Defekten oder Entzündungen der Basalmembran (Glomerulonephritis) sowie nach extrem proteinreicher Kost (sog. Überlaufproteinurie) auftreten.

Im Harn auftretende Proteine binden an einen speziellen pH-Indikator (z.B. Tetrabromphenolblau). Durch die damit verbundene Konformationsänderung kommt es zu einer Farbänderung des Indikators. Da die Reaktion relativ unspezifisch ist, muss ein positiver Befund besonders kritisch gesehen werden.

Glucose

Bei normaler Stoffwechsellage wird keine oder nur sehr wenig Glucose im Urin ausgeschieden. Erst ab einem Schwellenwert von ca. 180 mg/dl im Plasma wird Glucose renal ausgeschieden, da die aktiven Glucose-Transporter im proximalen Tubulus gesättigt sind. Somit deuten hohe Konzentrationen an Glucose im Urin auf eine diabetische Stoffwechsellage hin. Aber auch der Verzehr größerer Mengen an Glucose oder Saccharose (Süßigkeiten, Kuchen) kann vorübergehend zu einem positiven Befund führen (sog. Alimentäre Glucosurie).

Der Nachweis von Glucose beruht auf einer gekoppelten enzymatischen Reaktion. Zunächst wird Glucose durch das Enzym *Glucose-Oxidase* zu Gluconsäure oxidiert. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert in Gegenwart einer *Peroxidase* einen Farbstoff, welcher dadurch seine Farbe ändert.

Ketonkörper

Ketonkörper werden bei einer entgleisten diabetischen Stoffwechsellsage oder nach längerem Fasten (Nulldiäten, Hungerstreik) gebildet und renal oder z.T. pulmonal ausgeschieden. Der Nachweis beruht auf einer Farbreaktion der Ketonkörper (insbesondere Aceton und Acetessigsäure) mit Nitroprussid-Natrium.

Durchführung

Es werden Combur®-Teststäbchen verwendet. Das Teststäbchen wird kurz (ca. 1 sec) in die Probe gehalten. Die Kante des Teststäbchens wird an der Gefäßwand abgestreift. Nach 60 sec kann die Farbe der Testfelder mit der Farbskala verglichen werden. Das Ergebnis wird protokolliert. Farbveränderungen, die nur an den Rändern der Testfelder oder nach mehr als 2 min auftreten sind diagnostisch ohne Bedeutung.

Nur deutliche Verfärbungen sind positiv zu werten! Oft ist hilfreich, die Teststreifen der Praktikumsteilnehmer untereinander zu vergleichen.

Alle Aluminiumröhren (mit Trockenmittel im Deckel) sofort wieder verschließen!

Es wird auf folgende Parameter geprüft: Nitrit
Eiweiß
Glucose
Keton

In der Harnanalyse sind **höchstens** 3 Bestandteile enthalten, bitte geben Sie **ein klares Ergebnis** der Harnstreifen-Analyse an (Analyse Nr. X enthält: a, b, c)! Protokolle ohne klare Aussage werden nicht angenommen!

Folgende **Fehlermöglichkeiten** bei der Harnanalytik eines Patienten sind zu beachten:

Einnahme von Arzneimitteln (z.B. Ascorbinsäure) und deren Metaboliten können das Testergebnis verfälschen (*warum?*).

Ausschließlich saubere Gefäße zur Harnsammlung verwenden (Einmalgefäß; auf Konservierungsmittel verzichten).

Morgenurin (Mittelstrahl) verwenden.

Bestimmte Arzneistoffe (z.B. Metamizol oder Nitrofurantoin) führen zu einer Verfärbung des Harns, welche jedoch als harmlos zu bewerten ist.

Urin im geschlossenen Gefäß im Kühlschrank nicht länger als 4 Stunden bis zur Urinuntersuchung aufbewahren.

2. Schwangerschaftstest

Immunologische Schwangerschaftstests beruhen auf dem Nachweis des Hormons HCG (Humanes Choriongonadotropin) im Urin oder Serum. Durch die Produktion von HCG wird die Progesteronausschüttung aufrechterhalten und die Gebärmutterhaut wird nicht abgestoßen. Die Funktionsfähigkeit der Gebärmutterhaut ist die Voraussetzung für die Einnistung einer befruchteten Eizelle. Der HCG-Spiegel steigt nach der Konzeption sehr schnell an und erreicht im 3. Monat sein Maximum. Nach der 12. Woche sinkt der Hormonspiegel wieder und bleibt bis zur Geburt relativ konstant. Mit Hilfe der immunologischen Methoden kann schon zum Zeitpunkt der erwarteten Regelblutung HCG im Urin und Serum nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Harnprobe bekommen Sie vom Assistenten einen handelsüblichen Schwangerschaftstest, den Sie nach Gebrauchsanweisung durchführen. Informieren Sie sich während des Praktikums über die genaue Funktionsweise des Schwangerschaftstests, der Ihnen vom Assistenten ausgehändigt wird (Gebrauchsanweisung). Protokollieren Sie diese in Ihren Unterlagen.

3. Nachweis von Blut im Stuhl

Blut im Stuhl ist ein Krankheitszeichen, das in jedem Fall eine gezielte Suche nach der Blutungsursache auslösen sollte.

Rotes Blut im Stuhl findet sich bei Blutungen aus Anus, Rektum und dem ersten Colonabschnitt.

Gastrointestinale Blutungen, die die Stuhlfarbe nicht sichtbar verändern, sind als okkulte Blutungen von großer diagnostischer Bedeutung.

Als Ursache für gastrointestinale Blutungen kommen neben gutartigen Magen- und Darmgeschwüren, Störungen in Blutgefäßen und durch Medikamente (Acetylsalicylsäure) verursachten Blutungen auch Polypen und Tumore des Darms in Frage. Die Früherkennung des Coloncarcinoms ist möglich, da nahezu 100 % der Karzinome und ein hoher Prozentsatz von Polypen intermittierend Blut verlieren und daher die Bestimmung von okkultem Blut im Stuhl zur Krebsvorsorge geeignet ist.

Die Entwicklung des Haemoccult-Testes bietet heute die Möglichkeit, den für das Laborpersonal unangenehmen Teil der Untersuchung vom Patienten durchführen zu lassen. Der Haemoccult-Test ist eine modifizierte Guajac-Reaktion. Ein Haemoccult-Testbriefchen enthält ein mit Guajac-Harz getränktes Filterpapier, das von der Vorder- und Rückseite her zugänglich ist. Der Stuhl wird vom Patienten in ein Feld auf der Vorderseite des Briefchens aufgetragen, das Briefchen verschlossen und dem Labor zugeschickt. Auf die Rückseite wird stabilisierte Wasserstoffperoxidlösung getropft. Das Resultat kann nach 30 Sekunden abgelesen werden.

Prinzip der Bestimmung

Das Filterpapier der Testbriefchen ist mit haltbarem GuajacHarz imprägniert. Die Entwicklerlösung enthält stabilisiertes Wasserstoffperoxid. Der Blutnachweis beruht auf der peroxidatischen Wirkung des Hämoglobins. Bei dem Kontakt mit dem Wasserstoffperoxid wird von diesem Sauerstoff abgespalten welcher den Farbindikator, das Guajac, oxidiert. Die Oxidation des Guajacs kann man an einer Blaufärbung erkennen.

Wegen der unterschiedlichen Zusammensetzung des Stuhls ist *in vivo* eine exakte Empfindlichkeitsgrenze nicht bestimmbar. *In vitro* wurde mit handelsüblichen Testbriefchen noch Blut in einer Verdünnung 1:5000 nachgewiesen.

Durchführung

Zur Erprobung des Tests wird vom Assistenten Kunststuhl ausgegeben (Durchführung wie in der Gebrauchsanweisung des Testbriefchens angegeben).

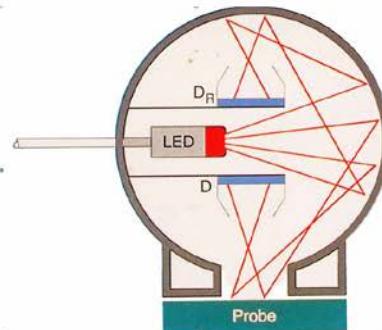
4. Blutuntersuchungen mit Hilfe des Reflotrons

Mit Hilfe der Reflexionsphotometrie lassen sich die Konzentration von Enzymen und metabolischen Substanzen im Blut schnell und einfach quantitativ bestimmen. Dazu werden Teststreifen für die einzelnen Parameter verwendet.

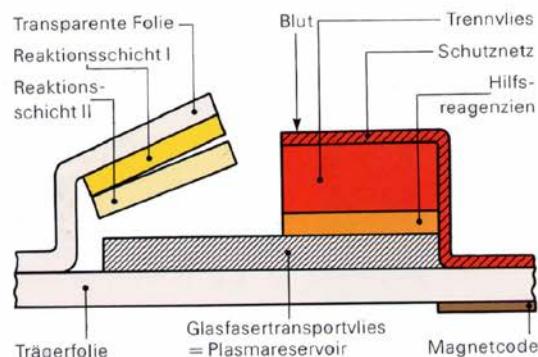
Trifft ein Strahlenbündel auf ein Objekt, wird ein bestimmter Anteil stets reflektiert. Dieser reflektierte Teil kann ähnlich wie der absorbierte Anteil für eine Konzentrationsbestimmung verwendet werden. Die Messung selbst erfolgt in der Ulbricht'schen Kugel (Abb.1). Von der Leuchtdiode (LED) kann Licht emittiert werden, deren Wellenlängen bei 567, 642 und 951 nm liegen. Der Lichtstrahl wird an der weißen Innenseite der Kugel mehrfach reflektiert. Somit verteilt sich das Licht gleichmäßig in der Kugel. Ein Referenz-Empfänger (D_R) misst die Intensität I_0 dieser diffusen Strahlung. Der Mess-Empfänger (D), der symmetrisch zum Referenz-Empfänger angeordnet ist, misst die vom Testfeld (Probe) diffus reflektierte Intensität I. Der Quotient aus I_0 und I ist proportional zum Reflexionswert R, aus dem dann die Konzentration des zu untersuchenden Parameters ermittelt wird.

Durch die Entwicklung des Reflexionsphotometers (Reflotron, Abb.2) konnte die Teststreifenanalytik wesentlich verbessert werden und erlaubt auch die Untersuchung von Serum und Vollblut. Abbildung 3 zeigt einen Teststreifen zur Untersuchung von Vollblut. Durch das Trennvlies werden die Erythrozyten zurückgehalten und nur das Plasma erreicht das Plasmareservoir und gelangt damit unter die Reaktionsschichten. Die Reaktion wird gestartet, indem die Reaktionsschichten durch den Messkopf in das Plasmareservoir hineingedrückt werden. Das Reflotron-Gerät wird auch in Apotheken eingesetzt. Für die Messungen werden nur μl -Mengen an Blut benötigt. Eine Diagnose darf ein Apotheker allerdings nicht stellen.

Die Blutentnahme erfolgt mit Softclix Pro® oder einer Lancette durch den „Patienten“ selbst (Fingerbeere). Wenn die Hand und die Finger sehr kalt sind, erweist es sich als hilfreich, die Finger zunächst zu massieren, um den Blutfluß zu stimulieren. Das austretende Blut wird mit einer innen heparinisierten Glaskapillare aufgesogen, so dass diese bis zum Eichring gefüllt ist (32 μl). In der



Ulbricht-Kugel



Reflotron-Gerät



Reflotron-Teststreifen

heparinisierten Kapillare kann das Blut durchaus für einige Minuten "gelagert" werden. Das Auftragen des Blutes auf den Teststreifen erfolgt so, dass mit der Glaskapillare das Vlies touchiert wird. Daraufhin wird das Blut automatisch durch Kapillarkräfte aus der Glaskapillare gesogen. Vor dem Einlegen des Messstreifens in das Gerät muss das auf das Vlies aufgebrachte Blut vollständig aufgesaugt worden sein.

Pro Gruppe sollen die Parameter wie Cholesterin, Triglyceride, Glucose und Hämoglobin bestimmt werden. Jede Person sollte mindestens einen Test selbst durchführen, wenn nicht persönliche Gründe dagegen sprechen.

Beachten Sie beim Umgang mit dem Gerät folgendes:

- Vor Gebrauch der Reagenzträger ist die Schutzfolie zu entfernen. Die Reaktionsschichten dürfen nicht mit den Händen berührt werden
- Beim Auftragen des Blutes auf den Reagenzträger müssen Überdosierungen vermieden werden, da es sonst zu Verunreinigungen des Gerätes kommen kann
- Der Reagenzträger sollte nach dem Auftragen zügig in das Gerät eingelegt werden. Dazu den Teststreifen waagerecht halten und auf die Anzeige „Schieber zu“ warten, die bestätigt, dass der Reagenzträger richtig arretiert wurde
- Das Gerät zeigt die benötigte Meßzeit an
- Die erhaltenen Werte werden vom Gerät ausgedruckt
- Nach der Messung den Reagenzträger aus dem Gerät entfernen

5. Blutdruckmessung

Die Fehlerquellen bei der Blutdruckmessung sollen mit zwei Geräten ausprobiert werden. Mit dem Handgelenkgerät werden drei Messungen durchgeführt: Arm auf Herzhöhe (richtig), sowie deutlich ober- und unterhalb des Herzens (falsch).

Das Tischgerät wird verwendet, um zu prüfen, welchen Einfluss Sprechen, Armbewegungen oder -erschütterungen auf die Messung haben.

Protokollieren und diskutieren Sie die Ergebnisse aller Versuchsteile!

Fragen zu allen Versuchsteilen

Informieren Sie sich über das Prinzip der Bestimmung der einzelnen Parameter (Reflotron, Harnanalyse, Schwangerschaftstest und Stuhluntersuchung).

Treffen Sie Aussagen über die Normalwerte der zu bestimmenden Parameter und über Ursachen für abweichende Werte.

Eignen Sie sich dabei auch das biochemische Hintergrundwissen (Funktion, Vorkommen, Stoffwechselzusammenhänge) an.

Kenntnisse über

- den Aufbau und die Funktionsweise des Reflotrons und der Teststreifen
- die Zusammensetzung des Blutes und die Funktion der Bestandteile
- die Zusammensetzung des Harns und die Herkunft der Bestandteile
- den Aufbau und Herstellung von Antikörpern

werden vorausgesetzt.