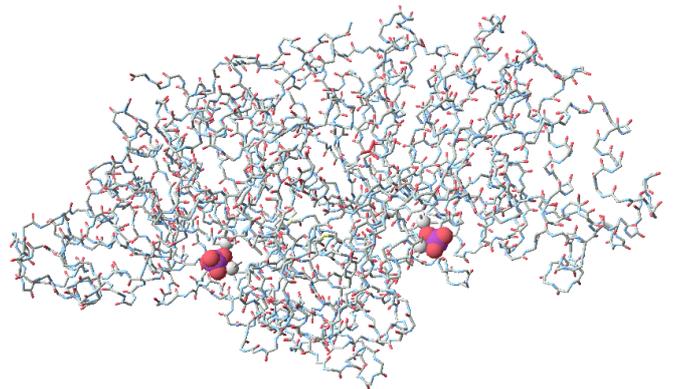
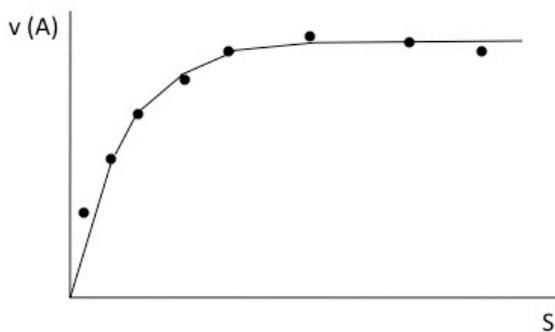
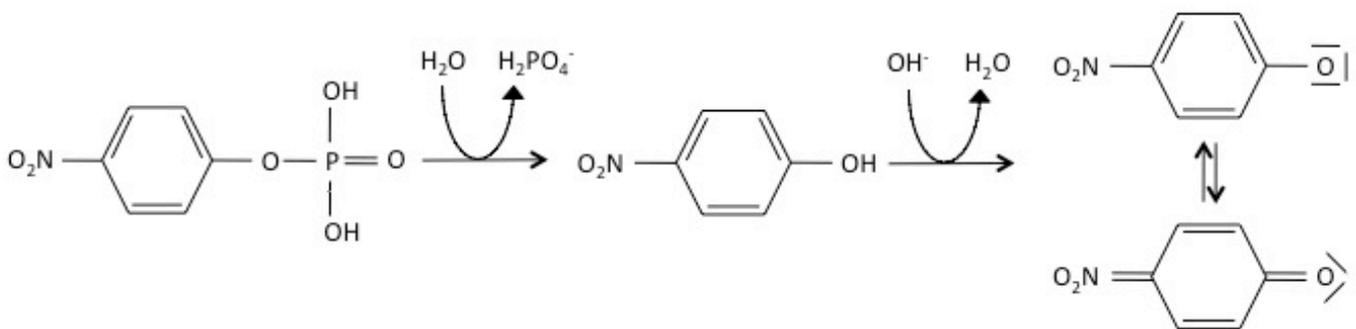


# BIOCHEMISCHE ÜBUNGEN I

## Unterlagen zum Übungsbeispiel

### ENZYMKINETIK



Für den Inhalt verantwortlich: Klara Soukup, Bakk.techn.

Wien, Juli 2012 (ergänzt Oktober 2018)

---

## INHALTSÜBERSICHT

<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>ZIEL DES BEISPIELS</b>	<b>3</b>
<b>DIE VERWENDETEN ENZYME UND AKTIVITÄTSASSAYS</b>	<b>3</b>
<b>THEORETISCHER HINTERGRUND</b>	<b>6</b>
<b>MICHAELIS-MENTEN-KINETIK</b>	<b>6</b>
<b>MÖGLICHKEITEN DER LINEARISIERUNG VON DATEN (PLOTS)</b>	<b>7</b>
<b>PRAKTISCHER TEIL</b>	<b>10</b>
<b>1 – ERMITTLUNG DER ENZYMVERDÜNNUNG</b>	<b>11</b>
<b>2 – ZEITABHÄNGIGKEITSEXPERIMENT (VARIIEREN DER INKUBATIONSZEIT)</b>	<b>11</b>
<b>3 – MICHAELIS-MENTEN-EXPERIMENT / <math>K_M</math>-WERT BESTIMMUNG (VARIIEREN DER SUBSTRATKONZENTRATION)</b>	<b>13</b>
<b>4 – TEMPERATURABHÄNGIGKEITSEXPERIMENT / TEMPERATUR-OPTIMUM (VARIIEREN DER INKUBATIONSTEMPERATUR)</b>	<b>15</b>
<b>5 – LAGERSTABILITÄTSEXPERIMENT / TEMPERATUR-STABILITÄT (VARIIEREN DER LAGERBEDINGUNGEN)</b>	<b>18</b>
<b>ZEITPLAN</b>	<b>21</b>

## Einleitung

### Ziel des Beispiels

Im Rahmen dieses Übungsbeispiels soll eine Enzymkinetik-Bestimmung durchgeführt werden. Dabei soll ermittelt werden, wie sich die Aktivität eines Enzyms durch verschiedene Parameter beeinflussen lässt. Die dafür zur Verfügung stehenden Parameter sind:

- ✓ die Inkubationszeit – d.h. was passiert, je länger das Enzym Zeit hat, mit seinem Substrat zu interagieren? Wird die Reaktionsgeschwindigkeit höher, je länger das Enzym Substrat in Produkt umwandelt?
- ✓ die Substratkonzentration – d.h. was passiert, je mehr Substrat dem Enzym zur Verfügung steht? Wird die Reaktionsgeschwindigkeit höher, je mehr Substrat im Ansatz vorhanden ist?
- ✓ die Inkubationstemperatur – d.h. was passiert, je höher die Temperatur ist, unter der das Enzym die Substratumwandlung durchführt? Nimmt die Geschwindigkeit gemäß thermodynamischer Prinzipien zu?
- ✓ die Bedingungen, unter denen das Enzym gelagert wird – d.h. was passiert, wenn das Enzym nicht auf Eis sondern bei Raumtemperatur aufbewahrt wird? Beeinträchtigt die Lagerung die Enzymaktivität?

Diese Parameter sollen im Laufe der Übungen variiert werden, um anschließend die eintretenden Veränderungen zu interpretieren.

Das sogenannte „Herzstück“ des Beispiels stellt dabei die Ermittlung der Kinetik dar, d.h. in welcher Form die Aktivität des Enzyms von der ihm zur Verfügung stehenden Konzentration an Substrat abhängt. Dabei soll unter geeigneten Versuchsbedingungen überprüft werden, ob es sich um eine Michaelis-Menten-Kinetik handelt.

### Die verwendeten Enzyme und Aktivitätsassays

Die untersuchten Enzyme stammen aus dem vorangegangenen Beispiel „Proteinaktivität“ (bei Prof. Altmann) und wurden aus verschiedenen Quellen gereinigt. Dabei sollte immer im Hinterkopf behalten werden, dass die Reinigung nicht spezifisch durchgeführt wurde und daher im verwendeten Proteinextrakt neben dem zu untersuchenden Enzym auch zahlreiche andere Proteine vorhanden sind, die eventuell Einfluss auf die Aktivitätsbestimmung nehmen. Manche Ergebnisse können daher anders ausfallen, als man es bei Untersuchung eines hochreinen Enzymextraktes erwarten würde.

Bereits im Beispiel „Proteinaktivität“ wurde eine Aktivitätsbestimmung durchgeführt, um die Enzymaktivität im gereinigten Extrakt zu ermitteln (Units/mL). Dabei wurde nach einem angegebenen „Kochrezept“ vorgegangen – einem sog. **Aktivitätsassay** (z.B. pipettiere 100  $\mu$ L Enzym + 100  $\mu$ L Substrat zusammen, inkubiere 15 min bei 37°C und beende die Reaktion durch Zugabe von 1 mL Stopplösung). Der inkubierte Ansatz wurde anschließend photometrisch gemessen.

Die angegebene Wellenlänge repräsentiert das Absorptionsmaximum des gebildeten Produktes. Das bedeutet, dass die Aktivitätsbestimmung auf der Messung des entstandenen Produktes beruht. Dabei kann die Zunahme an Produkt mit der Zeit (d.h. die Zunahme der Absorption) als Maß für die Aktivität (d.h. eigentlich die „Arbeitsgeschwindigkeit“) des Enzyms angenommen werden.

$$v = \frac{dP}{dt} \cong A$$

Um eine andere Form des Aktivitätsassays kennen zu lernen, sollen in diesem Beispiel die Proteinextrakte getauscht werden. Die entsprechenden Angaben werden von den Tutoren ausgegeben.

Einige Beispiele für verwendete Enzyme:

- ✓ Saure Phosphatase
- ✓ Pyrophosphatase
- ✓ Polyphenoloxidase
- ✓ Galactosidase
- ✓ Glucosidase
- ✓ Mannosidase
- ✓ Hexosaminidasen z.B. Glucosaminidase („β-Hex“)
- ✓ Peroxidase

Dabei beruhen sämtliche Aktivitätsassays auf einem ähnlichen Prinzip: die katalysierte Reaktion resultiert durch Abspaltung einer bestimmten Gruppe in der Bildung eines chromogenen Produktes, dessen Färbung photometrisch gemessen wird. Als Beispiel sei hier die Reaktionsgleichung der Phosphatase angegeben, bei der es durch Abspaltung der Phosphatgruppe von para-Nitrophenylphosphat zur Bildung von para-Nitrophenol (4-Nitrophenol) kommt. Dieses Produkt liegt unter basischen Bedingungen (wird durch Zugabe der Stopplösung erreicht) in deprotonierter Form vor (Phenolat) und weist eine intensive Gelbfärbung auf. Die deprotonierte Form kann dabei in zwei Grenzformen vorliegen (benzoide vs. chinoide Struktur). Die Absorption wird bei 403 nm gemessen.

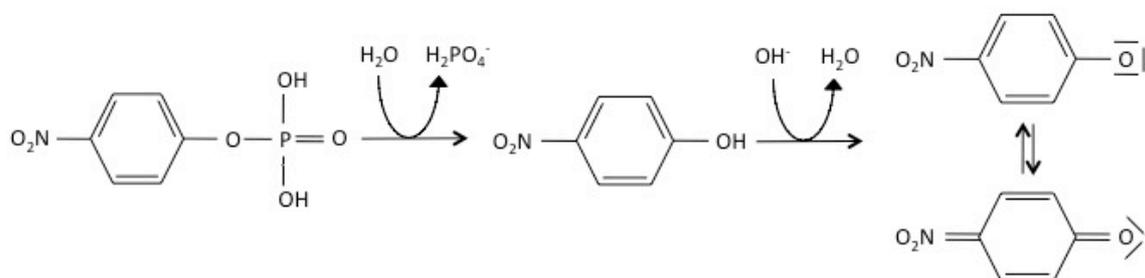
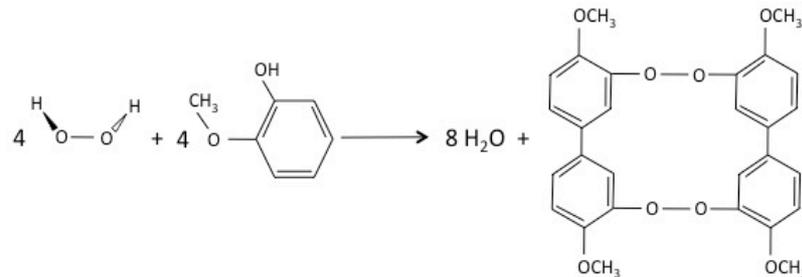


Abbildung 1 Durch Phosphatase katalysierte Reaktion (Bildung von 4-Nitrophenol)

Bei den meisten Aktivitätsassays beträgt die Inkubationszeit 15 min bei 37°C und anschließend wird die Produktbildung photometrisch bestimmt. Ausnahmen stellen z.B. Polyphenoloxidase und Peroxidase dar. Bei den von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen erfolgt die Produktbildung so rasch, dass eine nach 15 min gemessene Absorption nicht mehr repräsentativ für die Enzymaktivität wäre. Daher erfolgt die Aktivitätsmessung „**real-time**“ – d.h. laufend vom ersten Kontakt des Enzyms mit seinem Substrat an über 2 min. Diese Assays werden direkt im Photometer durchgeführt, wobei das Gerät alle 20 sec den entsprechenden Absorptionswert aufzeichnet.



**Abbildung 2** Die Bildung von Tetraguaiacol aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Guaiacol als Beispiel für eine von Peroxidase katalysierte Reaktion

## Theoretischer Hintergrund

### Michaelis-Menten-Kinetik

Dieses Kapitel soll nur der kurzen Wiederholung der Grundlagen der Enzymkinetik dienen, um die wichtigsten Grundbegriffe wieder in Erinnerung zu rufen. Genauer wurde bereits in anderen Lehrveranstaltungen durchgenommen.

Eine enzym-katalysierte Reaktion, die der Michaelis-Menten-Theorie folgt, lässt sich darstellen wie folgt:



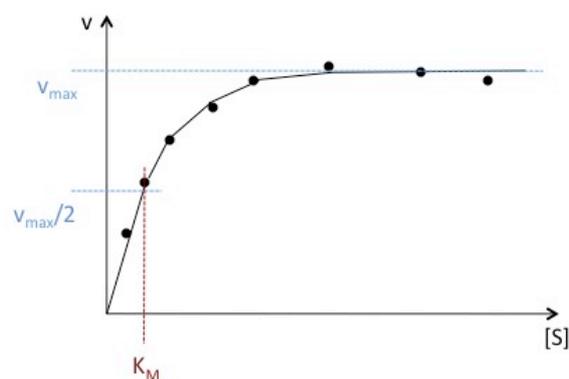
Die Reaktionskonstante des ersten Reaktionsschritts (Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes aus freiem Enzym E und Substrat S) ist  $k_1$ , die der Rückreaktion dementsprechend  $k_{-1}$ , und die des zweiten Schritts (Zerfall des Komplexes in freies Enzym und Produkt)  $k_2$ .

Nach Michaelis-Menten lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit nach folgender Gleichung ermitteln:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Bei einer enzymatisch katalysierten Reaktion nach dem Michaelis-Menten-Modell herrscht ein hyperbolischer Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der zur Verfügung stehenden Substratkonzentration. Im Anfangsbereich nimmt die Geschwindigkeit linear mit der Substratkonzentration zu. Ab einer gewissen Konzentration beginnt die Kurve abzuflachen und erreicht schließlich ein Plateau – d.h. es tritt Sättigung auf. In diesem Bereich nimmt die Konzentration keinen weiteren Einfluss auf die Geschwindigkeit – diese hat ihr Maximum erreicht.

Die wichtigen Parameter im Zusammenhang mit der Charakterisierung der Kinetik eines Enzyms sind die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) und die Michaelis-Konstante ( $K_M$ -Wert), welche jene Substratkonzentration darstellt, bei der das Enzym mit halb-maximaler Geschwindigkeit arbeitet. Der  $K_M$ -Wert beschreibt die Affinität des Enzyms zum Substrat – je niedriger der  $K_M$  eines Enzyms für ein Substrat ist, desto spezifischer erfolgt die Reaktion d.h. es genügen bereits niedrige Substratkonzentrationen, um das Enzym mit halbmaximaler Geschwindigkeit arbeiten zu lassen.



**Abbildung 3 Michaelis-Menten-Kurve**

Zusammenhang Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration bei einer enzymatisch katalysierten Reaktion

Die Michaelis-Konstante ist definiert als:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

## Möglichkeiten der Linearisierung von Daten (Plots)

Um anhand einer Kinetik-Kurve charakteristische Werte wie  $K_M$  oder  $v_{\max}$  zu ermitteln, muss die aufgenommene Kurve mittels komplizierter mathematischer Prozesse exakt angepasst werden. Da  $v_{\max}$  einen Wert darstellt, dem sich die Kurve nur asymptotisch nähert, ist eine solche Auswertung keineswegs trivial. Es stehen dazu diverse Software-Tools zur Verfügung.

Im Falle unseres Beispiels soll eine einfache Auswertung mittels MS Excel durchgeführt werden. Zu diesem Zweck können die gemessenen Daten linearisiert werden, d.h. es erfolgt eine rechnerische Umformung, welche die Auswertung erleichtert. Diese Vorgangsweise wird auch in der täglichen Laborpraxis oft gewählt, da man so rasch zu ziemlich genauen Ergebnissen kommt.

### Lineweaver-Burk Plot

Am bekanntesten ist die doppelt reziproke Linearisierung mittels Lineweaver-Burk Plot. Dabei wird der Kehrwert der gemessenen Arbeitsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Kehrwert der eingesetzten Substratkonzentration aufgetragen.  $K_M$  und  $v_{\max}$  können wie dargestellt abgelesen werden.

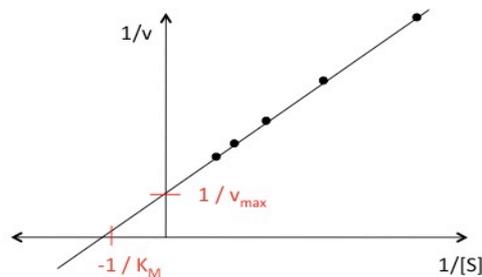


Abbildung 4 Lineweaver-Burk Plot

Der Lineweaver-Burk Plot hat jedoch einen signifikanten Nachteil: aufgrund der doppelt reziproken Umformung der Daten kommt es zu einer immer größeren Fehlerzunahme, je kleiner die Messwerte sind. Außerdem ist die Verteilung der Messpunkte im Plot nicht mehr äquidistant, was auch zu großen Ungenauigkeiten führen kann.

Aus diesen Gründen sollte bevorzugt eine andere Methode der Datenlinearisierung gewählt werden.

### Hanes Plot

Eine gute Alternative stellt der Hanes Plot dar, bei dem die eingesetzten Substratkonzentrationen direkt auf der x-Achse aufgetragen werden. Für die y-Achse werden die Substratkonzentrationen durch die jeweils gemessenen Geschwindigkeiten dividiert.

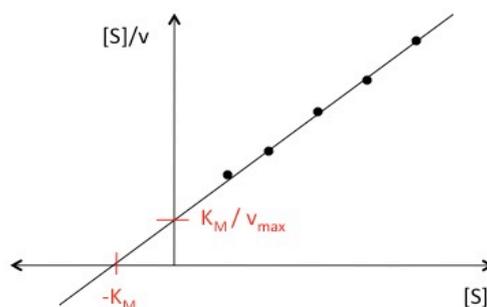


Abbildung 5 Hanes Plot

Da nur **eine** mathematische Umformung der Daten erfolgt, bleibt der Abstand zwischen den Messpunkten gleich (wenn die eingesetzten Substratkonzentrationen äquidistant gewählt wurden)

und auch die Größe des Fehlers verändert sich nicht mit der Größe der gemessenen Daten. Ein Nachteil dieser Darstellung liegt in der Tatsache, dass die eingesetzte Substratkonzentration auf beiden Achsen auftritt. Dadurch fließen Fehler, die durch Pipettierungenauigkeiten entstehen, doppelt in die Berechnung ein.

Der Hanes Plot gilt als die bevorzugte Linearisierungs-Methode. Auch im Rahmen dieses Übungs-Beispiels soll die  $K_M$ -Wert Berechnung anhand eines Hanes Plot durchgeführt werden.

### Eadie-Hofstee Plot

Auch beim Eadie-Hofstee Plot wird das Problem der unregelmäßigen Verteilung der Messpunkte und der Fehlervergrößerung überwunden, indem auf der y-Achse direkt die Arbeitsgeschwindigkeit aufgetragen wird. Für die x-Achse wird die Arbeitsgeschwindigkeit durch die eingesetzte Substratkonzentration dividiert.

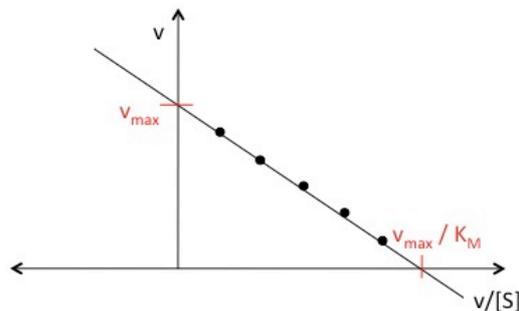


Abbildung 6 Eadie-Hofstee Plot

Der Nachteil des Eadie-Hofstee Plots liegt darin, dass die Geschwindigkeit auf beiden Achsen verwendet wird und sich daher bei der Auswertung Ungenauigkeiten der Geschwindigkeits-Bestimmung (Messung) vergrößern. Dadurch sinkt die Genauigkeit der  $v_{\max}$  und  $K_M$ -Berechnung.

Bei der Erstellung von Plots dieser Art ist es wichtig zu bedenken, dass eine erfolgreiche Daten-Linearisierung nur dann möglich ist, wenn die gemessene Kinetik-Kurve tatsächlich dem Michaelis-Menten-Verlauf folgt. Bei manchen Enzymen bzw. Proteinlösungen kann es zu Abweichungen kommen und es kann daher schwierig sein, eine „schöne“ Michaelis-Menten-Kurve zu erhalten. Außerdem folgen nicht alle Enzyme der Michaelis-Menten-Kinetik.

Bei Enzymen, die einen extrem großen  $K_M$ -Wert aufweisen, kann es sein, dass beim ersten Versuch das  $v_{\max}$ -Plateau noch nicht erreicht wurde, weil die eingesetzte Substratkonzentration noch nicht hoch genug war. Die aufgenommene Kurve zeigt dann einen linearen Verlauf, ohne die „Abknick-Phase“ zu erreichen. In diesem Fall müssen höhere Substratkonzentrationen hergestellt werden, um auch den Endbereich der Michaelis-Menten-Kurve zu erreichen. Nur so kann eine erfolgreiche Auswertung mittels Plot-Berechnung erfolgen.

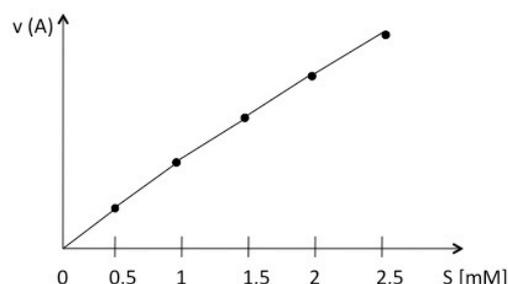
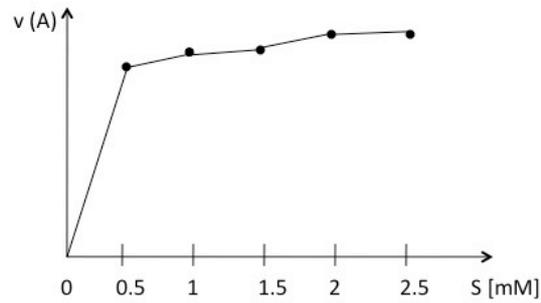


Abbildung 7 Hoher  $K_M$ : eingesetzte Substratkonzentrationen sind zu niedrig, um die gesamte Kurve zu erfassen

Umgekehrt kann es bei Enzymen mit sehr kleinem  $K_M$ -Wert passieren, dass die niedrigste gemessene Substratkonzentration noch zu hoch ist, um in den linearen Bereich der Michaelis-Menten-Kurve zu fallen. Dann muss diese noch weiter verdünnt werden, damit auch dieser Kurvenbereich aufgezeichnet werden kann.



**Abbildung 8** Niedriger  $K_M$ : eingesetzte Substratkonzentrationen sind zu hoch, um die gesamte Kurve zu erfassen

#### Quellen:

BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L: *Biochemie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin (2003); S. 222-228

<http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzass/substrate.htm> (vom 15.6.2012)

## Praktischer Teil

In diesem Kapitel soll Genaueres zu den einzelnen Experimenten erläutert werden, die im Laufe der beiden Übungstage durchgeführt werden.

- Besonders wichtig ist es, die **Reihenfolge** dieser Experimente zu verstehen, da meist das Ergebnis eines Experiments die weitere Vorgangsweise bestimmt bzw. die Voraussetzung für weitere Versuche darstellt. Daher ist es während der Übungen auch besonders wichtig, nach jedem Experiment sofort die Auswertung durchzuführen und diese mit den Tutoren zu besprechen, um gemeinsam die nächsten Schritte zu überlegen.
- **Jeder Student führt seine eigene Versuchsreihe durch.** Dabei kann natürlich zusammengearbeitet werden – wichtig ist jedoch, dass jeder seine eigenen Ergebnisse protokolliert und interpretiert. Die Erfahrung zeigt, dass es empfehlenswert ist, seine eigenen Versuche auch selbst zu pipettieren. Unbedingt vermieden werden sollten Operatorwechsel zwischendurch – das schlägt sich meist in der Qualität der gemessenen Ergebnisse nieder.
- Bevor mit den Experimenten begonnen wird sollten sämtliche benötigten **Lösungen** (Puffer zur Enzymverdünnung, Substrat-Stocklösung, Stopplösung, evtl. weitere Farbreagenzien) hergestellt werden. Dazu muss berechnet werden, wie viel von jeder Lösung pro Experiment benötigt wird. Für diese Berechnung ist eines besonders wichtig:

**> Sämtliche Versuche werden in Doppelbestimmung durchgeführt! <**

- Die Herstellung der Lösungen kann im Team zu viert erfolgen. Bei der Aufrundung der errechneten Mengen sollte immer beachtet werden, wie teuer die jeweilige Substanz ist – daher bitte nach der Berechnung mit den Tutoren absprechen, wieviel von welcher Lösung tatsächlich hergestellt werden soll.
- Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass jedes Experiment einen **Blindwert** verlangt. Dieser wird nicht bei jedem Experiment auf dieselbe Weise ermittelt! Der Blindwert unterscheidet sich vom „Leerwert“ dadurch, dass **alle** Lösungen darin enthalten sind, während beim Leerwert die untersuchte Lösung weggelassen wird. Beim Blindwert muss sichergestellt werden, dass die Lösungen keine Möglichkeit haben, miteinander zu reagieren (z.B. Enzym und Substrat – diese müssen daher durch Stopplösung voneinander getrennt werden!). Ansonsten wird der Blindwert genauso behandelt wie die Versuchsansätze und daher immer in **Doppelbestimmung** gemessen. Der Blindwert wird bei der Auswertung von allen Messwerten abgezogen – auch von sich selbst, wodurch ein Nullpunkt ermittelt wird („Absorption 0“).
- **WICHTIG:** bitte sämtliche Enzymlösungen (auch Verdünnungen) **immer auf Eis aufbewahren!** Die Aktivität nimmt sonst im Laufe des Tages ab. Substratlösungen, Puffer und Stopplösung können bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die eigene Enzymverdünnung muss am zweiten Übungstag frisch hergestellt werden, da über Nacht die Aktivität stark abnehmen kann. Wichtig dabei ist, dass die Verdünnung auf dieselbe Weise wie am Vortag hergestellt wird.
- Im Protokoll unbedingt angeben, mit **welchem Enzym** beim Kinetik-Praktikum gearbeitet wurde! Dieses ist unterschiedlich je nach Beispiel (Proteinaktivität / Proteinbestimmung / Enzymkinetik).

## 1 – Ermittlung der Enzymverdünnung

★ **Ziel:**

Ermittlung einer Enzymverdünnung, um im **linearen Messbereich des Photometers** zu arbeiten

Je nach den Ergebnissen des Beispiels „Proteinaktivität“ werden verschiedene Enzymverdünnungen getestet (von den Tutoren angegeben). Damit wird jeweils der Aktivitätsassay ausgeführt und anschließend überprüft, in welchem Bereich die gemessene Absorption liegt. Ziel ist es, eine Absorption zu erreichen, die **zwischen ca. 0.4 – 0.6** liegt, da in diesem Bereich gemessene Werte linear und damit einigermaßen verlässlich reproduzierbar sind.

Dieses Experiment ist sozusagen ein „Vor-Experiment“, da es die Grundlage für alle weiteren Schritte ist. Hier kann ausnahmsweise in Einfach-Bestimmung gearbeitet werden.

Nach Abschluss dieses Experiments erhält **jeder Student seine „eigene“ Verdünnung**, mit der er alle weiteren Versuche durchführt. Dazu bitte die gemessenen Werte mit den Tutoren besprechen. Die Tutoren legen anschließend eine entsprechende Verdünnung pro Student fest, d.h. von da an muss jeder seine eigene Versuchsreihe durchführen.

☞ **Durchführung:**

1. Enzymverdünnungen von den Tutoren erfragen und herstellen (in Puffer!)
2. Aktivitätsassays lt. Angabe mit diesen durchführen (Einfachbestimmung)
3. Absorptionen bei angegebener Wellenlänge messen
4. Ergebnisse mit Tutoren besprechen – eigene Verdünnung erfragen

→ **Blindwert:** einen BW für jede Enzymverdünnung erstellen, wobei alle Lösungen enthalten sein müssen ohne miteinander zu reagieren, d.h. man pipettiert z.B. Enzym-Stopplösung-Substrat (Reihenfolge ist egal, solange die Stopplösung zugesetzt wird, bevor Enzym und Substrat miteinander reagieren können).

✍ **Für's Protokoll:**

Wichtig ist die Angabe der **gewählten Verdünnung**, mit der weitergearbeitet wird und eine Erklärung, warum diese Verdünnung gewählt wurde. Außerdem sind sämtliche Original-Messdaten anzugeben. **Die Methoden sind in den eigenen Worten zu beschreiben (können auch graphisch ergänzt werden): Wenn Sie als Methode nur „siehe Unterlagen“ angeben, müssen Sie ein korrigiertes Protokoll nachreichen. Das verwendete Enzym müssen Sie auch nennen.**

## 2 – Zeitabhängigkeitsexperiment (Variieren der Inkubationszeit)

★ **Ziel:**

Ermittlung einer Inkubationszeit, um im **linearen Aktivitätsbereich des Enzyms** zu liegen

Bei diesem Experiment steht der Parameter **Inkubationszeit** im Vordergrund. Eine geeignete Inkubationszeit für den Aktivitätsassay zu ermitteln ist eine wichtige Voraussetzung für alle weiteren Versuche – vor allem für das Michaelis-Menten-Experiment (Ermittlung der Enzymkinetik).

Eine Vorbedingung, um Kinetikmessungen durchzuführen, ist die Arbeit im linearen Aktivitätsbereich des Enzyms. Gemessen werden sollen **Anfangsgeschwindigkeiten** ( $v_0$ ), da sonst keine Kinetikkurve

aufgenommen werden kann. Jede Enzymaktivität (gemessen als Geschwindigkeit der Produktbildung oder „Arbeitsgeschwindigkeit“) flacht nach einer gewissen Zeit ab und erreicht irgendwann ein Plateau. Daher muss sichergestellt werden, dass die im Aktivitätsassay angegebene Inkubationszeit noch im linearen Geschwindigkeitsbereich des Enzyms liegt. Aus diesem Grund wird nun die Inkubationszeit variiert und eine Zeitabhängigkeitskurve aufgenommen.

Nach Abschluss dieses Experiments wird die **Inkubationszeit angepasst**, daher ist es wieder wichtig, die Ergebnisse auszuwerten und mit den Tutoren zu besprechen, bevor weitergearbeitet werden kann. Die Tutoren legen dann eine Inkubationszeit fest, die einen guten Kompromiss zwischen gutem Absorptionswert (0.4 – 0.6) und linearer Enzymgeschwindigkeit darstellt.

☞ **Durchführung:**

1. Aktivitätsassay mit der eigenen Verdünnung durchführen und jeweils in Doppelbestimmung inkubieren:
  - a. 5 Minuten
  - b. 10 Minuten
  - c. 15 Minuten
  - d. 20 Minuten

Dabei können alle Ansätze parallel angesetzt und gestartet werden. In 5-Minuten-Abständen wird dann jeweils ein Doppel-Ansatz gestoppt. Die Stopplösung sollte direkt nach Ablauf der Zeit im Wasserbad zugegeben werden, da sonst eine zeitliche Ungenauigkeit hinzukommt.

→ **WICHTIG:** Zeit GENAU einhalten! **Stoppuhr** verwenden!

2. Absorptionen bei angegebener Wellenlänge messen (die gestoppten Ansätze können bei Raumtemperatur aufgehoben und anschließend zusammen gemessen werden)
3. In Excel eine Zeitabhängigkeitskurve erstellen (siehe unten)
4. Ergebnisse mit Tutoren besprechen – gemeinsam Inkubationszeit anpassen

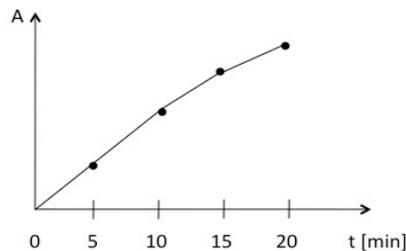
→ **Blindwert:** ist in diesem Fall ein „0-Minuten“-Blank, d.h. Enzym und Substrat dürfen keine Zeit haben, miteinander zu reagieren. Die Durchführung erfolgt also genauso wie zuvor (z.B. Enzym-Stopplösung-Substrat). Für die Auswertung werden alle Messwerte um den Blindwert korrigiert (d.h. subtrahieren). Wichtig ist es, den Blindwert auch „von sich selbst“ zu subtrahieren, um einen Nullpunkt für die Grafik zu erhalten.

→ **WICHTIG:** Enzym und Substrat werden bei verschiedenen Temperaturen aufbewahrt (Enzym: Eis, Substrat: RT). Die Reaktion soll bei 37°C (Ausnahme: real-time Messungen) stattfinden. Wenn Enzym und Substrat sofort zusammenpipettiert werden, dauert es eine gewisse Zeit, bis beide die Reaktionstemperatur erreicht haben. Dabei kommt es zu einer sog. „**Lag-Phase**“, welche vor allem in der Zeitabhängigkeitskurve sofort sichtbar wird.

Diese Lag-Phase muss unbedingt verhindert werden, indem Enzym und Substrat getrennt voneinander **vorgewärmt** werden. Dazu in den Reaktionsröhrchen das benötigte Volumen an Enzym vorlegen, in ein extra Röhrchen ein Aliquot an Substratlösung (Menge, die für alle Ansätze der Versuchsreihe benötigt wird + ein bisschen mehr) pipettieren und alles im Wasserbad für 1-2 min vorwärmen. Dann die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden Volumens Substratlösung zu den vorbereiteten Röhrchen starten. **Diese Vorgangsweise gilt für alle Versuche!**

 **Für's Protokoll:**

Anzugeben sind die Originalmesswerte (eventuelle Ausreißer hervorheben und als solche beschriften) sowie die Zeitabhängigkeitskurve für die eigene Verdünnung. Außerdem ist die Kurve zu interpretieren und die **angepasste Inkubationszeit** anzugeben (inkl. Erklärung, warum bzw. wie diese angepasst wurde).



**Abbildung 9** Zeitabhängigkeitskurve – nach 20 Minuten tritt meist schon eine Abflachung der Kurve auf, manchmal kann die Abflachung aber auch bereits nach 15 Minuten sichtbar werden

### 3 – Michaelis-Menten-Experiment / $K_M$ -Wert Bestimmung (Variieren der Substratkonzentration)

★ **Ziel:**  
Ermittlung des  **$K_M$ -Werts** des eigenen Enzyms

Dieses Experiment stellt das „Herzstück“ unseres Beispiels dar. Unter den zuvor ermittelten Bedingungen (eigene Enzymverdünnung sowie angepasste Inkubationszeit) werden nun zur Bestimmung des  $K_M$ -Werts Aktivitätsassays mit **unterschiedlichen Substratkonzentrationen** durchgeführt.

Dabei wird von der ursprünglich angegebenen Substrat-Stockkonzentration (laut „Rezept“ – meist 5 mM) als höchster Konzentrationsstufe ausgegangen und in **äquidistanten** Schritten verdünnt. Dazu muss nicht unbedingt eine eigene Substrat-Lösung pro Verdünnung hergestellt werden, sondern es sollte ein Pipettierschema überlegt werden, bei dem von der ursprünglichen Stocklösung ausgegangen wird und die eingesetzten Volumina variiert werden.

→ **Beispiel:** die ursprüngliche Substrat-Stocklösung hat eine Konzentration von 5 mM, d.h. äquidistante Schritte wären 5 mM – 4 mM – 3 mM – 2 mM – 1 mM und 0 mM (Blindwert).

Da von der Substrat-Stocklösung immer 100  $\mu\text{L}$  eingesetzt werden, kann dieses Volumen entsprechend der Verdünnung unterschiedlich zusammengesetzt werden – siehe Tab. 1.

Konzentration	5 mM-Stock	H <sub>2</sub> O	Gesamtvolumen
5 mM	100 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
4 mM	80 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
3 mM	60 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
2 mM	40 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
1 mM	20 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
0 mM	0 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

**Tabelle 1** Pipettierschema für Michaelis-Menten-Experiment am Beispiel Substratstocklg. 5 mM

Wichtig ist, dass das Substrat-**Gesamtvolumen immer gleich** bleibt und den ursprünglichen Assay-Bedingungen (laut „Rezept“) entspricht, da sonst unterschiedliche Verdünnungseffekte eintreten und die gemessenen Absorptionen nicht vergleichbar sind.

Nachdem die Messungen bei diesen Substratkonzentrationen (wieder in Doppelbestimmung!) abgeschlossen sind, muss unbedingt sofort die **Auswertung** erfolgen. Dabei kann es sein, dass der gewählte Konzentrationsbereich nicht den gesamten Verlauf der Michaelis-Menten-Kurve abdeckt. Das wird aus der graphischen Auswertung schnell deutlich und sollte unbedingt mit den Tutoren besprochen werden.

Dabei können **2 Fälle** eintreten:

1. Die Konzentrationen liegen bereits im  $v_{\max}$ -Bereich der Kinetik (Plateau), d.h. es müssen **stärkere Verdünnungen** gemessen werden, um auch den Anfangsbereich zu erfassen
2. Die Konzentrationen liegen im extremen Anfangsbereich der Kinetik (lineare Steigung ohne Abflachung), d.h. es müssen **höher konzentrierte Substrat-Stocklösungen** hergestellt werden, um auch den Endbereich zu erfassen.

Die weitere Vorgangsweise wird mit den Tutoren besprochen. Für die Auswertung sollten in jedem Fall die Kinetik-Kurve UND der Hanes-Plot erstellt werden, da nur beide Grafiken in Verbindung eine verlässliche Aussage ermöglichen.

Bei diesem Experiment wirkt sich auch eine ungenaue Arbeitsweise stark auf die Ergebnisse aus. In vielen Fällen muss die **gesamte Messung wiederholt** werden, da die ersten Ergebnisse zu keiner Aussage führen. In 99% der Fälle fällt der 2. Versuch deutlich genauer aus 😊 Bitte mit den Tutoren absprechen und nicht wundern, wenn das Experiment wiederholt werden muss.

#### ☞ **Durchführung:**

1. Substratverdünnungen und Pipettierschema überlegen und mit Tutoren abklären (!)
2. Aktivitätsassays unter ermittelten Bedingungen (eigene Enzymverdünnung und angepasste Inkubationszeit) mit diesen Verdünnungen durchführen (in Doppelbestimmung)
3. Absorptionen bei angegebener Wellenlänge messen
4. In Excel die Daten auswerten: eine Geschwindigkeitskurve UND den Hanes-Plot erstellen (siehe unten)
5. Ergebnisse mit Tutoren besprechen – eventuell weitere Substratverdünnungen messen bzw. gesamtes Experiment wiederholen

→ **Blindwert:** der Blindwert ist bei diesem Experiment die „0-Substrat-Konzentration“ – diese auch in Doppelbestimmung messen (genauso wie die anderen Ansätze behandeln d.h. mit-inkubieren) und für die Auswertung von allen Messwerten subtrahieren. Wichtig ist wieder, den Blindwert auch „von sich selbst“ zu subtrahieren, um einen Nullpunkt zu erhalten.

#### ✎ **Für's Protokoll:**

Anzugeben sind die Originalmesswerte (eventuelle Ausreißer hervorheben und als solche beschriften) sowie die Michaelis-Menten-Kurve (= Geschwindigkeitskurve, Substratabhängigkeitskurve) und der Hanes-Plot für die eigene Verdünnung. Außerdem ist der

**$K_M$ -Wert** in beiden Grafiken einzuzichnen und mittels Hanes-Plot auszurechnen. Dabei sollen auch die  $K_M$ -Werte der Gruppenkollegen (selber Enzymextrakt) angegeben werden und eventuelle Abweichungen kommentiert werden. **Einheiten (mM bzw. mmol/L) nicht vergessen!**

→ **ACHTUNG:** bei der Erstellung der Grafiken (und somit auch für die Berechnung des  $K_M$ ) ist die **finale Substratkonzentration im Ansatz** zu verwenden! Diese ist nicht ident mit der eingesetzten Substrat-Stocklösung (z.B. 5 mM – 4 mM – usw.)! Es muss berechnet werden, wie die Substratlösung im Ansatz weiter verdünnt wurde, z.B. durch Zugabe von Puffer bzw. Enzymlösung. Für die Michaelis-Menten-Kinetik ist die Konzentration an Substrat im Ansatz, d.h. während der Reaktion, relevant. Sobald die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung beendet wird, kann das Enzym nicht weiter arbeiten – daher ist das Stopplösungsvolumen für die Berechnung nicht einzubeziehen. Wichtig ist lediglich, welche Substratkonzentration dem Enzym während der Reaktion zur Verfügung steht.

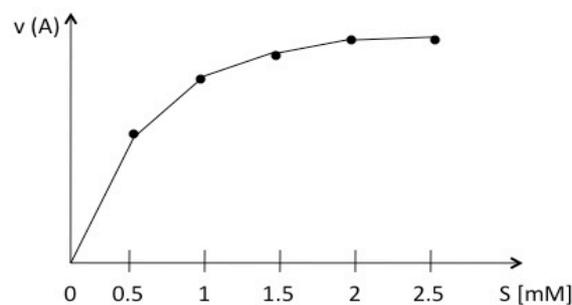


Abbildung 10 Michaelis-Menten-Kurve

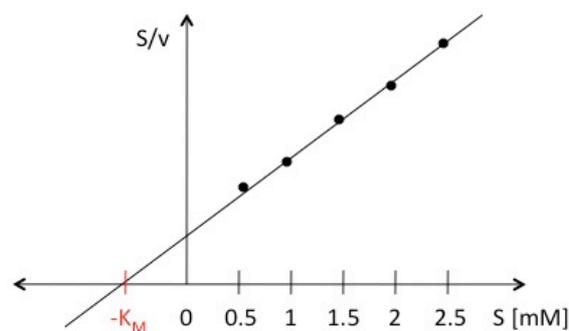


Abbildung 11 Hanes-Plot

#### 4 – Temperaturabhängigkeitsexperiment / Temperatur-Optimum (Variieren der Inkubationstemperatur)

★ **Ziel:**  
Ermittlung der Temperatur, bei welcher die **höchste Enzymaktivität** vorliegt

Nun wird der Parameter „Temperatur“ variiert. Dabei soll herausgefunden werden, wie sich unterschiedliche Inkubationstemperaturen auf die Enzymaktivität bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit auswirken.

Dabei ist es besonders wichtig im Hinterkopf zu behalten, dass es sich bei der untersuchten Reaktion um eine enzymatisch katalysierte handelt. Das bedeutet, dass neben des thermodynamischen Effekts (höhere Temperatur → höhere Energie → chemische Reaktion läuft schneller ab) eine gegenläufiges Phänomen auftritt, welches sich umgekehrt auswirkt. Bei hohen Temperaturen kommt es zur **Denaturierung** des Enzyms – dadurch nimmt die Aktivität im Proteinextrakt ab.

Ermittelt werden soll daher ein **Temperatur-Optimum**, bei dem die Aktivität noch positiv beeinflusst wird, bevor sie aufgrund der konkurrierenden Denaturierungs-Reaktion beginnt abzunehmen.

Wenn es zur Denaturierung des Enzyms kommt, wird dies in Form eines **Präzipitats** im Reaktionsröhrchen sichtbar. Ein solches Präzipitat kann deutlich ausfallen, kann aber manchmal auch nur in Form einer leichten Trübung der Lösung erkennbar sein. Da eine Lösung, die Präzipitat enthält, weder verlässlich pipettiert werden kann, noch deren Absorption reproduzierbar gemessen werden kann (aufgrund von **Streuung**, die in der Küvette durch die Partikel auftritt), muss jede trübe Lösung vor der Messung **abzentrifugiert** werden. Dazu überführt man die Messlösung in ein Eppendorf-Hütchen und zentrifugiert in der Eppendorf-Zentrifuge für 1 Minute bei 13 200 rpm (Tutor fragen!).

Die Messungen erfolgen anhand des Aktivitätsassay-Rezepts, wobei wiederum die eigene Verdünnung und die selbst ermittelte Inkubationszeit eingehalten werden. Die Auswertung soll gleich anschließend in Excel durchgeführt (siehe unten) und mit den Tutoren besprochen werden.

#### ☞ **Durchführung:**

1. Aktivitätsassay mit der eigenen Verdünnung durchführen und jeweils in Doppelbestimmung inkubieren bei:
  - a. 0°C bzw. 4°C (auf Eis, am Platz)
  - b. Raumtemperatur (am Platz)
  - c. 37°C (im Wasserbad)
  - d. 55°C (im Wasserbad)
  - e. 75°C (im Wasserbad)

→ **WICHTIG:** Timing überlegen, da es sonst hektisch werden kann, die verschiedenen Wasserbäder im Auge zu behalten!

2. Absorptionen bei angegebener Wellenlänge messen (die gestoppten Ansätze können bei Raumtemperatur aufgehoben und anschließend zusammen gemessen werden)
3. In Excel eine Temperaturabhängigkeitskurve erstellen (siehe unten)
4. Ergebnisse mit Tutoren besprechen

→ **Blindwerte:** gibt es bei diesem Experiment verschiedene. Da es bei 55°C und 75°C zu einem relativ großen Energieeintrag durch Wärmezufuhr kommt, muss sichergestellt werden, dass die beobachtbare Produktbildung tatsächlich auf Arbeit des Enzyms zurückzuführen ist. Die Abspaltung einer Gruppe vom Substratmolekül, die anschließend zur Färbung führt, kann bereits durch die hohe Temperatur selbst passieren (thermischer Zerfall).

Daher muss bei den beiden höchsten Temperaturen ein „Substrat-Blank“ gemessen werden, bei dem nur das Substrat für die ermittelte Inkubationszeit inkubiert wird (Menge nach Angabe im Aktivitätsassay, z.B. 100 µL). Nach Ablauf der Zeit wird dem Blank genau wie den anderen Ansätzen Stopplösung zugesetzt. Abschließend muss aber auch noch die Enzymlösung zugefügt werden, damit wieder alle Lösungen im Ansatz vorhanden sind (Gesamtvolumen muss stimmen!).

Für die Temperaturen zwischen 0°C und 37°C kann wieder der „0-Minuten“-Blank (z.B. Enzym-Stopplösung-Substrat) verwendet werden. Da der ursprüngliche Aktivitätsassay ja bei 37°C (bzw. RT bei den real-time Beispielen) durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es bei dieser Temperatur noch zu keiner thermischen Zerfallsreaktion kommt.

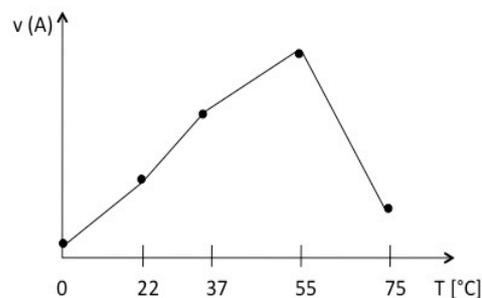
Für die Auswertung werden alle Messwerte um den jeweiligen Blindwert korrigiert (d.h. subtrahieren).

→ **WICHTIG:** Es gilt wieder zu beachten, dass Enzym und Substrat bei verschiedenen Temperaturen aufbewahrt werden. Die Reaktion soll bei verschiedenen Temperaturen stattfinden. Um eine „**Lag-Phase**“ zu verhindern, müssen beide Lösungen wieder getrennt voneinander **vorgewärmt** werden. Die Vorgangsweise kann genau wie vorher erfolgen, egal bei welcher Temperatur gemessen wird.

**Vorsicht ist allerdings bei 75°C geboten**, da es hier schon bei einer Inkubation des Enzyms von wenigen Minuten zur Denaturierung kommen kann. Daher sollte die Vor-Inkubation hier max. 30 sec betragen!

#### **Für's Protokoll:**

Anzugeben sind die Originalmesswerte (eventuelle Ausreißer hervorheben und als solche beschriften) sowie die Temperaturabhängigkeitskurve für die eigene Verdünnung. Außerdem ist die Kurve zu interpretieren und das **ermittelte Temperaturoptimum** anzugeben.



**Abbildung 12** Temperaturabhängigkeitskurve – bei Enzymen aus pflanzlichen Quellen ist meist ein Temperaturoptimum bei 55°C zu beobachten, wobei die Gründe dafür unklar sind

#### **SONDERFALL Real-Time Messungen:**

Wie in der Einleitung beschrieben, müssen manche Aktivitätsassays (z.B. Peroxidase) direkt im Photometer durchgeführt werden, wobei die Produktmessung über einen Zeitraum von zwei Minuten laufend erfolgt (Absorption wird direkt vom Gerät alle 20 sec gemessen). Da es nicht möglich ist, das Photometer auf verschiedene Temperaturen zu bringen und der Aktivitätsassay daher nicht bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden kann, wird je nach Enzym ein Alternativexperiment durchgeführt. Genaueres dazu wird von den **Tutoren** erläutert.

## 5 – Lagerstabilitätsexperiment / Temperatur-Stabilität (Variieren der Lagerbedingungen)

★ **Ziel:**

Ermittlung des **Einflusses von Lager-Temperatur und -Verdünnung** auf die Enzymstabilität

Zum Schluss werden in einem weiteren Experiment verschiedene **Einflussfaktoren der Enzymlagerung** untersucht. Dazu gehören einerseits die Temperatur sowie andererseits die Verdünnung, in welcher das Enzym aufbewahrt wird.

Wichtig ist zu verstehen, dass bei diesem Experiment eine unterschiedliche **Vorbehandlung** des Enzyms notwendig ist – und zwar soll das Enzym **alleine** vorbehandelt werden, d.h. es erfolgt eine Art „Vorinkubation ohne Substrat“. Ähnliche Studien müssen in Unternehmen durchgeführt werden, wenn es darum geht zu ermitteln, unter welchen Bedingungen z.B. reine Enzymextrakte eingelagert bzw. versendet werden müssen. Diese Bedingungen variieren von Extrakt zu Extrakt. Natürlich können die Proben, die in diesem Praktikum verwendet werden, keinesfalls als reine Enzymextrakte angesehen werden, da es sich um komplexe Proteinlösungen handelt. In diesem Zusammenhang ist es aber wiederum interessant zu beobachten, wie sich die Lagerstabilität verändert, da z.B. Proteasen, die „unser“ Enzym abbauen, unter bestimmten Bedingungen aktiver sind als unter anderen.

Um den Einfluss der Lagertemperatur zu ermitteln, wird jeweils ein **Aliquot** des Enzymextrakts bei verschiedenen Temperaturen (siehe unten) für **mindestens 1 Stunde** eingelagert. Die Zeit kann selbst gewählt werden – es ist empfehlenswert, den 2. Übungstag mit der Einlagerung zu beginnen und in der Lagerzeit das Temperatur-Optimum-Experiment durchzuführen, damit keine unnötige Wartezeit entsteht. Genauer dazu wird am Übungstag von den Tutoren erklärt. Die genaue Lagerzeit kann daher je nach Arbeitsgeschwindigkeit der Gruppenmitglieder variieren – wichtig ist, dass sie:

- **mindestens 1 Stunde** beträgt
- und bei **allen Gruppenmitgliedern gleich** ist.

D.h. dass der erste Student einer Gruppe, der mit den Messungen des Lager-Experiments beginnt, die eingelagerten Aliquots aller Gruppenmitglieder sammelt. Die **genaue Lagerzeit wird notiert**. In der Zwischenzeit zwischen „einsammeln“ und bis die anderen Gruppenmitglieder zu messen beginnen, können sämtliche Aliquots **auf Eis** aufbewahrt werden (wie bei den anderen Experimenten). Die Zeit bis zur Messung ist dann irrelevant.

Zur Untersuchung des Verdünnungs-Effekts wird jedem Studenten einer Gruppe (meist zu viert) eine Enzym-Verdünnung zugeteilt, die dieser herstellt und in Aliquots bei den jeweiligen Temperaturen einlagert. **Diese Verdünnung ist nicht ident mit derjenigen Verdünnung, die bei allen vorigen Experimenten verwendet wurde!** Es handelt sich dabei lediglich um eine „Vor-Verdünnung“.

Nach Ablauf der Lagerzeit muss die eingelagerte Verdünnung sinnvoll weiter verdünnt werden. Dabei wird von den Tutoren eine „Ziel-Verdünnung“ pro Gruppe festgelegt, bei welcher letztendlich die Messung erfolgen soll. Diese „Ziel-Verdünnung“ wird anhand der vorherigen Experimente gewählt und sollte eine Absorption von ca. 0.5 liefern (mit den Tutoren absprechen!). Um die Vorgangsweise zu verdeutlichen, sei ein Beispiel angegeben.

→ **Beispiel:** die Ziel-Verdünnung einer 4er-Gruppe soll **1:150** betragen.

Die Tutoren legen folgende Vor-Verdünnungen für die Lagerung fest: **unverdünnt, 1:10, 1:50, 1:100**.

Jeder Student wählt eine Vor-Verdünnung und muss sich nun überlegen, wie er am Ende der Lagerzeit diese weiter verdünnen muss, um auf die Ziel-Verdünnung 1:150 zu kommen (Tab. 2).

Vor-Verdünnung	Ziel-Verdünnung	notwendiger weiterer Verdünnungsschritt	Volumenteile
unverdünnt	1:150	1:150	1 (unv) + 149 Puffer
1:10	1:150	1:15	1 (1:10) + 14 Puffer
1:50	1:150	1:3	1 (1:50) + 2 Puffer
1:100	1:150	1:1.5	1 (1:100) + 0.5 Puffer

**Tabelle 2** Verdünnungstabelle für das Lager-Experiment (Beispiel)

Um zu berechnen, welches Volumen der Vor-Verdünnung eingelagert werden muss, sollte sich jeder Student bereits ein eigenes Pipettierschema überlegen. Pro Temperatur muss ein Aliquot eingelagert werden. Pro Temperatur erfolgt 1 Messung in Doppelbestimmung – d.h. es werden 2 x 100 µL Enzymverdünnung benötigt (Ausnahme: real-time Messungen!). Um also am Ende pro Temperatur (d.h. pro Aliquot) **mindestens** 200 µL der Ziel-Verdünnung zu erhalten, muss überlegt werden, wie die Vor-Verdünnung weiter verdünnt werden kann.

Z.B. wenn die Vor-Verdünnung 1:50 beträgt, muss diese 1:3 weiter verdünnt werden – d.h. um mind. 200 µL zu erhalten, können 100 µL der Vorverdünnung + 200 µL Puffer pipettiert werden. Das Gesamtvolumen beträgt dann 300 µL – also genug, um die Doppelbestimmung durchzuführen.

Dies soll nur als Beispiel dienen – jeder Student sollte sich ein eigenes Schema überlegen, wie der weitere Verdünnungsschritt durchgeführt werden kann.

➔ **WICHTIG:** es sollten **niemals < 40 µL** pipettiert werden (Ungenauigkeit der Pipetten)!

Weiters gilt zu beachten, dass es während der Lagerung des Enzyms zur **Denaturierung** kommen kann (wie zuvor beschrieben). Dabei kann durchaus eine große Proteinmenge ausfallen – das Präzipitat muss wieder unbedingt **abzentrifugiert** werden (Eppi-Zentrifuge), bevor weitergearbeitet wird. Aus diesem Grund sollte unbedingt mehr Volumen an Vor-Verdünnung pro Temperatur eingelagert werden, als für den weiteren Verdünnungsschritt benötigt wird. In unserem Beispiel benötigt der Student 100 µL seiner Vor-Verdünnung zum Weiterarbeiten – er sollte daher zur Sicherheit 300 µL einlagern, um ausreichend Lösung zur Verfügung zu haben, wenn große Proteinmengen präzipitieren. Bitte unbedingt vor dem Einlagern mit den **Tutoren** abklären!

Die Messungen erfolgen anschließend wieder anhand des ursprünglichen Aktivitätsassay-Rezepts. Die Auswertung wird in Excel durchgeführt (siehe unten) und mit den Tutoren besprochen.

#### ☞ **Durchführung:**

1. Ziel-Verdünnung und Vor-Verdünnungen mit Tutoren besprechen
2. Vor-Verdünnung wählen, Pipettierschema überlegen, notwendiges Volumen pro Aliquot berechnen und von Tutoren überprüfen lassen
3. Vor-Verdünnung für alle Aliquots herstellen, in 6 Eppis aliquotieren und bei folgenden Temperaturen je ein Eppi für mind. 1 Stunde einlagern:
  - a. -20°C (im Gefrierschrank #2)
  - b. 0°C bzw. 4°C (auf Eis, am Platz)
  - c. Raumtemperatur (am Platz)
  - d. 37°C (im Wasserbad)
  - e. 55°C (im Wasserbad)
  - f. 75°C (im Wasserbad)

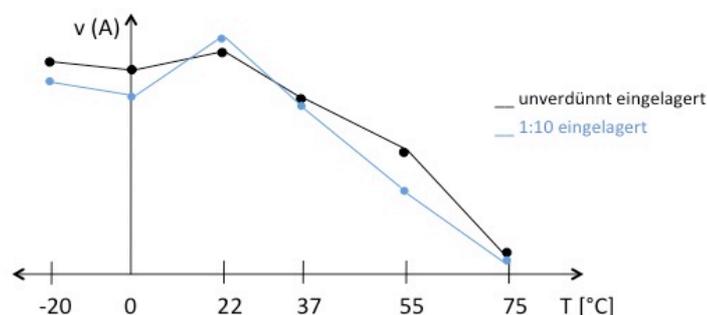
Für's Einlagern im Wasserbad stehen Styropor-Schwimmer zur Verfügung (Tutoren / Thomas fragen).

4. der erste Student, der mit dem Temperatur-Optimum fertig ist und die Lager-Messung beginnt, holt alle Aliquots der Gruppe von den verschiedenen Temperaturen und lagert sie bis alle fertig sind auf Eis
5. Ziel-Verdünnung pro Temperatur anhand des eigenen Pipettierschemas herstellen
6. Aktivitätsassay jeweils in Doppelbestimmung durchführen und bei 37°C inkubieren (Ausnahme: real-time)
7. Absorptionen bei angegebener Wellenlänge messen (die gestoppten Ansätze können bei Raumtemperatur aufgehoben und anschließend zusammen gemessen werden)
8. In Excel eine Lagerstabilitätskurve erstellen (siehe unten)
9. Ergebnisse mit Tutoren besprechen

→ **Blindwert:** Da der Aktivitätsassay wie schon beim Zeitabhängigkeits- und beim Michaelis-Menten-Experiment wie im ursprünglichen Rezept angegeben bei 37°C durchgeführt wird (Ausnahme: real-time), muss lediglich der „0-Minuten“-Blank (z.B. Enzym-Stopplösung-Substrat) gemessen werden. Dabei ist es egal, welche der eingelagerten Enzymlösungen dafür verwendet wird, da es hier keine großen Unterschiede gibt. Wichtig ist aber zu beachten, dass die verwendete Enzymverdünnung mit der Ziel-Verdünnung übereinstimmt.

#### **Für's Protokoll:**

Anzugeben sind die Originalmesswerte aller Gruppenmitglieder (eventuelle Ausreißer hervorheben und als solche beschriften) sowie die Lagerstabilitätskurve für alle Vor-Verdünnungen (alle Gruppenmitglieder – in 1 Diagramm). Außerdem ist die Kurve hinsichtlich der Einflussfaktoren zu interpretieren.



**Abbildung 13** Lagerstabilitätskurve – bei diesem Beispiel lässt sich anhand der Kurve kein signifikanter Einfluss der Verdünnung ableiten

**ZEITPLAN**

(ungefähr) für Enzymkinetik-Beispiel

Zeit (ca.)	1. ÜBUNGSTAG	2. ÜBUNGSTAG
9:30 – 10:00		9:30 – Kurze Vorbesprechung im Labor (mit Tutoren)
10:00 – 11:00	9:30 – Vorbesprechung im Seminarraum (mit Prof. Wilson)	Einlagerung der Enzymverdünnungen für Lagerstabilitätsexperiment
11:00 – 12:00	Herstellung sämtlicher benötigter Puffer und Lösungen	Temperaturoptimum-Experiment Ermittlung des <u>Temperaturoptimums</u>
12:00 – 13:00	und Ermittlung der <u>Arbeitsverdünnung</u>	Lagerstabilitätsexperiment (Messungen) Ermittlung des <u>Einflusses von Lagertemperatur und Verdünnung</u>
13:00 – 14:00	Zeitabhängigkeitsexperiment Ermittlung des <u>linearen Arbeitsbereichs</u>	- PAUSE -
14:00 – 15:00		
15:00 – 16:00	Michaelis-Menten-Experiment Ermittlung des <u>K<sub>m</sub>-Wertes</u>	<b>Zwischen 14:00 und 16:30</b> – Nachbesprechung für Enzymkinetik und Proteinbestimmung im Seminarraum (mit Prof. Wilson)
16:00 – 17:00		