



# Anleitungen zum Übungsbeispiel **PROTEINREINIGUNG**

Version November 2004

<b>Inhaltsübersicht:</b>	Seite
<b>Teil I: Über Enzyme und die Kunst sie zu reinigen</b>	
Einiges über Enzyme	2
Herstellung eines Extrakts	3
Reinigungsstrategien	3
Reinigungsparameter	5
<b>Teil II: Spezielle Methoden</b>	
Puffer	6
Dialyse	8
Ammonsulfatfällung	9
pH-Meter Bedienung	11

# Teil I: Über Enzyme und die Kunst sie zu reinigen

## Einiges über Enzyme

Enzyme sind, so wie die meisten Proteine, äußerst empfindliche Wesen. Ihre molekulare Integrität und "richtige" (=biologisch aktive) Konformation können sehr leicht verlorengehen, was sich in einem Verlust ihrer Enzymaktivität zeigt. Proteasen, also Enzyme, welche andere Proteine in kleine Stücke reißen, stellen eine Bedrohung dar, besonders z.B. wenn wir Zellen aufschliessen und dabei den Inhalt der Lysosomen freisetzen. Hohe Temperatur, organische Lösungsmittel, Detergentien, saures oder basisches Milieu, Gefrieren-Tauen und Anderes können die Raumstruktur von Proteinen zerstören. Diese "Denaturierung" eines Proteins ist ein meist irreversibler Prozeß.

Jedes Protein ist eine unverwechselbare Persönlichkeit mit besonderen Fähigkeiten und wunden Punkten. Manche sind robust wie Schlittenhunde, andere sind empfindlich wie die Prinzessin auf der Erbse.

Ein paar allgemeine Regeln helfen uns jedoch:

- ⇒ Zügig arbeiten: eine Enzymreinigung muß "durchgezogen" werden - eine Frage der Einteilung und von im Labor verbrachten Nächten und Wochenenden.
- ⇒ Kühl arbeiten: Wegen der Gefahr durch Proteasen darf die Enzymlösung nie grundlos bei Raumtemperatur herumstehen. Immer auf Eis oder im Kühlschrank lagern. (Die chromatographische Reinigung selbst wird aber oft bei Raumtemperatur durchgeführt).

außerdem:

- ⇒ Kontakt mit Metall vermeiden: Metallische Oberflächen können Schwermetalle an die Lösung abgeben.
- ⇒ Kontakt mit Sauerstoff minimieren - also nicht wild schütteln oder rühren. Oft erweist es sich als günstig, Reduktionsmittel wie 2-Mercaptoethanol o.ä. zuzusetzen.
- ⇒ Die Proteinlösung sollte nicht allzu sehr verdünnt sein, da es dann zu Adsorption an Oberflächen und somit zu einem Verlust an Enzymaktivität kommt. Allerdings mag auch eine zu dicke Suppe den Erfolg eines Reinigungsschrittes vereiteln.

Schon etwas spezifischer sind folgende Fragen:

- In welchem pH-Bereich ist mein Protein stabil ?  
(der gewünschte pH wird dann durch Puffer gewährleistet)
- Unter welchen Bedingungen ist es löslich ? Dazu sind drei Dinge zu sagen:
  - i Einige Proteine lösen sich bei sehr geringen Ionenstärken nicht.
  - ii Alle Proteine präzipitieren bei hohen Ionenstärken (bes. bei Ammonium und Sulfat-Ionen).
  - iii Membranebundene Proteine lassen sich nur durch Detergentien solubilisieren.  
Man muß dann die Reinigung in Gegenwart von z.B. Triton X100 durchführen.
- Benötigt das Enzym bestimmte Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  etc. ?

Es gilt also einiges zu erfahren über ein Enzym und dies gelingt über die Messung der Enzymaktivität unter verschiedenen Bedingungen und nach verschiedenen Behandlungen. Soviel Geduld werden wir mit unserem Enzym hier nicht haben.

## Herstellung eines Extraktes

Ausgangsmaterialien für die Gewinnung von Enzymen oder allgemein Proteinen können sein:

Flüssigkeiten wie Blut, Milch, Kulturüberstände von Zellen

Tierische Gewebe wie Muskel, Leber

Pflanzliche Gewebe wie Samen, Blätter, Speicherorgane

Hefezellen

Bakterienzellen

Der erste Schritt der meisten Enzymreinigungen besteht in der "Extraktion", was oft sogar das Lösen des Proteins beinhaltet. Sie beginnt mit der Zerkleinerung des Gewebes, in dem unser Enzym enthalten ist. Bei trockenen Stoffen (z.B. Samen) hilft hier eine ganz normale Kaffeemühle. Anschliessend wird das Mehl eine bis mehrere Stunden mit dem Extraktionspuffer gerührt.

Bei feuchtem Material, also z.B. tierischem Geweben verwenden wir einen Küchenmixer. Die Zerkleinerung erfolgt aber meist schon in Gegenwart eines Extraktionspuffers. Das Gewebe soll schon in kleine Stücke geschnitten sein. Dann genügt es, den Mixer für z.B. 3 mal 10 sec einzuschalten, um das Material zu homogenisieren. Pflanzliche Zellen sind robuster und man sollte daher etwas länger mixen - z.B. 3 mal 30 sec oder noch länger (zwischen den Mixphasen den Inhalt von außen mit Eis kühlen).

Hefe- und Bakterienzellen verlangen nach sehr drastischen Maßnahmen wie Kugelmöhlen, Frenchpress und Ähnlichem. Im kleinen Maßstab kann man Bäckerhefe aber auch ganz gut entweder durch Schütteln mit Glaskugeln oder durch „Autolyse“, d.h. Zersetzung der Hefezellwand durch eigene Enzyme, die man nur ein wenig unterstützen muß, aufbrechen.

Vom Extrakt spricht man meist erst dann, wenn unlösliche Bestandteile entfernt wurden. Dies erfolgt selten durch Filtration und meist durch Sedimentation in der Kühlzentrifuge. **30 min bei 5000 rpm** werden fast immer ausreichen, um einen weitgehend klaren Extrakt zu erhalten. Eine leichte Trübung wird durch die sogenannten "Mikrosomen" (Bruchstücke von ER und Golgi) verursacht und läßt sich nur durch sehr hohe Zentrifugalkräfte (im UZ-Bereich) entfernen. Oft enthalten Proben Lipide (oder auch Lipoproteine), die obenauf schwimmen. Einfach abschöpfen so gut es geht. Um diese etwas unästhetische Arbeit zu vermeiden, kann man die trockene Probe mit Aceton extrahieren und mit dem sogenannten Aceton-Pulver arbeiten - bei sehr fetten Geweben vielleicht sinnvoll.

## Reinigungsstrategie

Eine Enzymreinigung besteht immer aus der Abfolge mehrerer Reinigungsschritte. Idealerweise sind es nur wenige, aber effektive Schritte, da jeder Schritt Zeit und Geld kostet und einen Verlust an Gesamtaktivität mit sich bringt. Man nützt alle möglichen Eigenschaften des Proteins aus. Seine Löslichkeit, seine Größe, seine Ladung, seine Oberflächen-Hydrophobizität oder seine bio-spezifische Wechselwirkung mit anderen Molekülen. Es gibt viele Möglichkeiten und Kombinationen, die zum Ziel führen. Und es gibt noch viel mehr Wege, die nicht dorthin führen. Ziel ist jedenfalls eine hohe Ausbeute an sehr reinem Enzym. Aber „rein“ kann ganz Unterschiedliches bedeuten, je nach dem Anwendungszweck (Waschmittel, biochemische

Forschung, Therapeutikum, Röntgenstrukturanalyse). Als sehr grobe Faustregel gilt, ein Protein ist rein, wenn es die einzige deutlich erkennbare Bande bei einer SDS-PAGE ausmacht.

Unser Rohextrakt enthält im wahrsten Sinn des Wortes noch alles Mögliche - nicht nur hunderte verschiedene Proteine. Nach dem Motto "*Auf einen groben Klotz gehört ein grober Keil!*" wird man sich hier oft für eine Fällung entscheiden, da man rasch das gewünschte Protein von einer Unzahl anderer Stoffe abtrennen kann und oft - bei fraktionierter Fällung - auch schon eine gewisse Reinigung von anderen Proteinen erreicht. Von den verschiedenen Fällungsmitteln (Salze, organische Lösungsmittel, Polyethylenglykol) ist es besonders Ammonsulfat, welches im Labor eingesetzt wird.

In grauer Vorzeit, also noch in den 70er Jahren hat man oft große Sorgfalt auf eine hohe Reinigungswirkung durch fraktionierte Fällungen gelegt. Dazu wurden fraktionierte Fällungen durchgeführt, bei der die Salzkonzentration in kleinen Schritten erhöht wurde. Nach jeder Salzzugabe wurde das Präzipitat abgetrennt und die Lösung mit mehr Salz versetzt. Heute macht man meist nur eine oder zwei Konzentrationsstufen.

Nicht selten ersetzt man die Ammonsulfatfällung überhaupt durch eine hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (HIC).

Man hat nun noch immer meist große Mengen an Protein, da das gewünschte Enzym noch in Begleitung vieler anderer Proteine ist. Es empfiehlt sich daher eine robuste Methode mit hoher Kapazität und sehr gerne kommt an dieser Stelle eine Ionenaustauschchromatographie (IEX). Allerdings fällt nach der Fällung die Probe in Gegenwart von viel Salz an, welches die IEX stört. Man muß also einen Entsalzungsschritt zwischenschalten und man kann erwägen, hierzu gleich eine Größentrennung mittels Gelfiltration zu verwenden.

Im Anschluß oder als Alternative kann man Hydroxyapatit-, Dye ligand-, oder Affinitäts-Chromatographie durchführen oder die IEX mit anderem pH-Wert bzw. anderem Ladungsvorzeichen durchführen. Bei einem solchen „Polier“-Schritt sollte man chromatographische Ausrüstung mit hoher Trennleistung einsetzen.

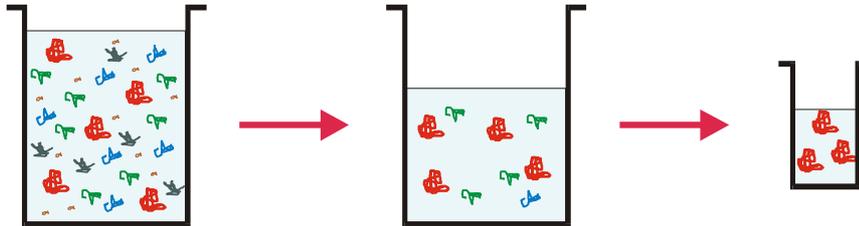
Die Kunst besteht darin, die verschiedenen Techniken so zu kombinieren, daß zwischen den Trennschritten möglichst wenig Konzentrations-, Entsalzungs- und Pufferwechselschritte notwendig sind.

Sonderfall: Da Enzyme nicht immer von leicht kultivierbaren Organismen in grossen Mengen erzeugt werden, stellt man immer mehr Proteine rekombinant her. Dies erlaubt das Anfügen einiger Aminosäuren, welches die Reinigung erleichtern. Sehr beliebt ist hier der sogenannte His-Tag, eine Abfolge von 6 His-Resten (z.B. am C-Terminus), welche das Rausfischen des rekombinanten Enzyms mittels Metallchelate-Chromatographie ermöglicht.

## Reinigungsparameter

Der Erfolg eines Arbeitsschrittes wird durch zwei Parameter ermittelt:

### Reinigungsfaktor und Ausbeute



Stellen wir uns das interessierende Protein als roten Knäuel vor, alle anderen Proteine, welche im Extrakt zunächst überwiegen, haben andere Farben. Nach einem ersten Reinigungsschritt sind viele der Begleitproteine verschwunden, manche ganz, manche nur teilweise. Nach einem weiteren Schritt wird das Verhältnis von Enzym zu Gesamtprotein noch höher, bis schließlich das einzige Protein in der Lösung das gewünschte Enzym ist. Leider kommt es im Verlauf der Reinigung unweigerlich auch zu einem gewissen Verlust an unserem Enzym. Dies beschreibt der Begriff **Ausbeute**. In der Graphik haben wir zunächst 5 „Einheiten“ (= 100 %) Enzym. Nach einem Arbeitsschritt sind es nur mehr 4 „Einheiten“, also 80 %. Am Ende bleiben uns noch 3 „Einheiten“, was einer Ausbeute von 60 % entspräche. Mathematisch ausgedrückt:

$$\text{Ausbeute (\%)} = \frac{\text{Gesamtaktivität (U) nach Reinigungsschritt}}{\text{Gesamtaktivität (U) vor Reinigungsschritt}} \times 100$$

Noch wichtiger ist die Frage, ob wir unser Enzym tatsächlich gereinigt bzw. gegenüber den anderen Proteinen angereichert haben. Dazu müssen wir zunächst das Verhältnis Enzym zu anderen Proteinen ermitteln, welches man als **spezifische Aktivität** bezeichnet.

$$\text{Spezifische Aktivität (U/mg)} = \frac{\text{Aktivität pro Vol. (U/mL)}}{\text{Proteinkonzentration (mg/mL)}}$$

haben, d.h. Der **Reinigungsfaktor** ergibt sich aus dem Vergleich der **spezifischen Aktivitäten** vor und nach einem Reinigungsschritt.

## Teil II: Spezielle Methoden

### Puffer

In der Biochemie sind Lösungen fast immer gepuffert. Es muß die **Art** Puffers, seine **Konzentration** und natürlich sein **pH-Wert** stimmen.

Die nominelle **Konzentration** eines Puffers ist die Summe der puffernden "Ionen" (z.B. Acetat + Essigsäure,  $\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$ , Ammoniak + Ammonium etc.).

Der **pH-Wert** muß in der Nähe der Dissoziationskonstante der Puffersubstanz liegen. Nur im Bereich von max.  $\pm 1$  um den  $\text{pK}_A$  ist eine brauchbare Pufferwirkung gegeben.

Es gibt vier im Prinzip richtige Möglichkeiten, einen Puffer des gewünschten pH-Wertes herzustellen.

1. Aus Tabellen die einzuwägenden Mengen an saurer und basischer Form ablesen. (VT: man braucht kein pH-Meter; aber es gibt kaum mehr solche Tabellen).
2. Man stellt zwei Lösungen her, beide mit der gewünschten Konzentration des Puffers: eine Lösung der sauren Form (also z.B. Essigsäure) und eine Lösung der basischen Form (z.B. Natriumacetat). Mithilfe eines pH-Meters mischt man nun bis zum richtigen pH-Wert. (Ausrechnen könnte man es auch, aber das wird nicht sehr genau)

3. **Empfohlene Standardmethode** Man stellt nur eine Lösung "genau" her und titriert mit dem Gegenion bis zum gewünschten pH-Wert.

Bei sauren Puffern legt man die Säure bzw. ein sauer reagierendes Salz vor und titriert mit NaOH oder KOH.

Beispiel 1: Sie wollen 1000 mL 0.1 M Na-Citrat-Puffer herstellen. Sie wägen 0.1 mol Zitronensäure (oder Essigsäure, Ameisensäure u.ä.) ein und füllen auf ca. 900 ml auf. Sie stellen die Lösung auf den Magnetrührer und fixieren die pH-Elektrode. Nun tropfen Sie vorsichtig Natronlauge (2-10 M) zu bis der gewünschte pH erreicht ist. Bleibt nur noch, bis zur Marke mit Wasser aufzufüllen.

PS: Die Genauigkeit der Marken von Bechergläsern reichen dafür völlig. Messuren sind also nicht nötig.

Beispiel 2: Phosphat-Puffer von pH 7.0. Problem: Die Phosphorsäure ist nur von ungefähre Konzentration und ziemlich unangenehm zu handhaben. Es empfiehlt sich daher ein sauer reagierendes Salz der Phosphorsäure zu verwenden. Zur Wiederholung des Stoffes früherer Jahre: Der  $\text{pK}_2 = 7.2$ ; werden Sie  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  oder  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  einwiegen ?

Basische Puffer werden fast ausnahmslos mit HCl eingestellt. Ganz selten mit Ameisensäure oder Essigsäure

4. Kaufen (einzige Möglichkeit für Mediziner, Molekularbiologen und FH-Absolventen)

Zur Vollständigkeit: Der pH-Wert eines Puffers ist temperaturabhängig, da sich der  $\text{pK}$ -Wert mit der Temperatur etwas ändert (Bsp:  $\text{dpK}_a/\text{dT}$  für Tris = -0.028, für Phosphat -0.0028). Ebenso kann sich der pH-Wert ändern, wenn man einen Puffer verdünnt.

Weitere Komponenten des Puffers können sein:

NaCl o. KCl wenn hohe Ionenstärke erwünscht

Ca<sup>2+</sup> oder andere zweiwertige Kationen

Protease-Inhibitoren

2-Mercaptoethanol oder Dithioerythritol zum Schutz vor Oxidation, besonders bei intrazellulären Enzymen

Polyvinylpyrrolidon zur Fällung von Polyphenolen aus pflanzlichen Extrakten

Glycerin, Mannit o.ä. zur Erhöhung der Proteinstabilität

nicht-ionische Detergentien zur Solubilisierung von Membranproteinen.

### Wichtige Puffer

Einzuwiegende Substanz	Einzustellen mit	pKa	Anmerkung
<u>anionische Puffer</u>			
Zitronensäure / Citrat	NaOH	3.13	
Milchsäure / Lactat	NaOH	3.81	
Ameisensäure / Formiat	NaOH	3.75	
--"	NH <sub>3</sub>		Flüchtiger Puffer (Gefriertrocknung)
Zitronensäure / Citrat	NaOH	4.76	
Essigsäure /Acetat	NaOH	4.76	
--"	NH <sub>3</sub>		Flüchtiger Puffer (Gefriertrocknung)
Zitronensäure / Citrat	NaOH	6.40	Zitrat/Phosphat-Mischpuffer über
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> / HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	KOH bzw. NaOH	7.2	sehr weiten pH-Bereich einsetzbar
Borsäure / Borat		9.23	nicht für Ionenaustausch
Hydr.-Carbonat / Carbonat		10.33	
<u>kationische Puffer</u>			
Piperazin	HCl	5.68	
L-Histidin	HCl	5.96	
Imidazol	HCl	7.00	
Triethanolamin	HCl	7.76	
--"	Essigsäure		Flüchtiger Puffer (Gefriertrocknung)
Tris	HCl	8.06	
Ethanolamin	HCl	9.50	
Ammoniak	HCl	9.25	für flüchtige Puffer, unbeständig
Glycin	HCl	9.78	

## Dialyse

Dies ist eine einfache, aber wirkungsvolle Methode zum Entsalzen oder Umpuffern von Protein-Lösungen. Die Poren von Standardschläuchen erlauben Molekülen bis zu einer Größe von 12-14.000 Da (molecular weight cut off) den Durchtritt. Proteine bleiben somit im Schlauch, Salze verteilen sich nach 2-5 h gleichmäßig auf das Innere und die Außenlösung.

Sie schneiden ein Stück Schlauch passender Länge von der Rolle ab. Da Sie das Volumen der Lösung kennen, läßt sich über den Schlauchumfang die nötige Länge ausrechnen. Die so ermittelte Länge multipliziert man noch mit knapp 1.5 bis 2, da Sie 1.) einen Knoten binden wollen und 2.) der Schlauchinhalt aufgrund seines höheren osmotischen Druckes etwas an Volumen zunimmt.

Vorsicht mit scharfen Gegenständen und spitzen Fingernägeln !

Der Schlauch wird nun zusammengerollt und in ein Becherglas mit dest. Wasser gelegt. [Man kann hier eine Prise EDTA zufügen – bei kleinen Proteinmengen empfehlenswert]. Das Ganze wird jetzt im Wasserbad etwa 5 min stark erhitzt bis gekocht. Dadurch wird der Schlauch weich und Proteasen werden zerstört.

Jetzt verdrillen Sie den Schlauch an einem Ende und machen einen einfachen Knoten (es sollen nicht mehr als 1-2 cm überstehen. Spülen Sie den Schlauch zunächst mit Wasser und dann, ev. mithilfe eines Trichters (vermeide Pasteurpipetten, Splittergefahr) mit Ihrer Probe. Diese sollte noch mindestens ein Viertel, besser ein Drittel des Schlauches frei lassen. Drücken Sie die Luft aus diesem Teil heraus und machen Sie möglichst am Ende des Schlauches einen zweiten Knoten. Das war's.

Der/die Kluge, also Sie, hat schon den Puffer zum Dialysieren kalt gestellt. Sie legen jetzt den Dialyse-Schlauch hinein und gehen in eine Vorlesung (z.B. Biochemie, Biochemische Analytik, Glykobiologie, Biochemische Arbeitsmethoden).

Der Dialyse-"Puffer" muß **mindestens einmal gewechselt** werden ! Das können Sie schon nach zwei, besser drei Stunden machen - das Gleichgewicht ist dann schon weitgehend erreicht. Generell ist es wirkungsvoller, die gleiche Gesamtmenge an Außenlösung auf mehrere Portionen zu teilen und öfters zu wechseln.

Den Schlauch schneiden Sie unmittelbar unter einem Knoten auf. Probe ausleeren und mit etwas Puffer nachspülen. Der Schlauch kann mehrmals verwendet werden, aber nur für ähnliche Proben!

## Ammonsulfatfällung

Fällungstechniken waren früher viel wichtiger und Sie werden nur mehr selten mit raffinierten Prozeduren der fraktionierten Fällung zu tun haben. Als erster Grobreinigungs- und Konzentrationsschritt hat die Ammonsulfatfällung aber immer noch große Bedeutung. Zu diesem Zweck reichen ein oder zwei Konzentrationsstufen aus. Man muß allerdings erwähnen, daß bei ausgefeilten Reinigungsstrategien heute sehr oft die Hydrophobe WW Chromatographie (HIC) zur Anwendung kommt.

Die Konzentration an Ammonsulfat bei der ein Fällungsschritt durchgeführt wird, gibt man in **Prozent Sättigung** an.

Eine gesättigte Lösung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (bei  $0^\circ\text{C}$ ) weist eine Dichte von 1.243 g/ml und eine Konzentration von 51.5 % (w/v) bzw. 3.9 mol/l auf. Das hilft uns aber nicht, wenn wir eine Proteinlösung auf z.B. 60 % Sättigung bringen sollen. Man verwendet dafür eine Tabelle (oder ein Nomogramm). Da wir mit gekühlten Lösungen arbeiten ist für uns eine Tabelle für  $0^\circ\text{C}$  geeigneter (in Büchern findet man daneben auch oft eine Tabelle für  $25^\circ\text{C}$ ).

### Ammonsulfat-Sättigung bei $0^\circ\text{C}$

A ... Ausgangssättigung

		Endsättigung / g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ für 1000 mL Lösung mit Sättigung A													
A	10	20	30	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
0	55	107	166	229	262	295	331	366	404	442	483	523	611	707	
5	26	80	139	200	232	266	300	336	373	411	450	491	578	671	
10		54	111	171	203	236	270	305	342	379	418	458	544	636	
20			56	84	115	145	177	210	244	280	316	392	476	565	
30				57	87	119	150	184	217	253	289	328	408	495	
40					29	59	90	122	155	190	225	262	340	424	
45						29	60	91	125	158	193	229	306	388	
50							30	61	93	127	161	197	272	353	
60									31	63	96	131	204	283	
70											32	66	136	212	
75												32	202	176	
80													68	141	
90														71	

Sie haben ein bestimmtes Volumen an Proteinlösung (ev. bereits mit einer gewissen

Konzentration an  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Die aus der Tabelle ermittelte Menge an festem Salz wird unter ständigem Rühren (Magnetrührer) zur schon kalten Probe in kleinen Portionen zugegeben, sodaß der Vorgang ca. 10 min dauert. Zu schnelle Zugabe führt zum teilweisen Ausfällen von Protein, das eigentlich erst bei höherer Sättigung präzipitieren sollte.

Obwohl meist sehr rasch eine erkennbare Fällung eintritt, wird der Endzustand erst nach einiger Zeit erreicht. Man läßt die Fällung also zumindest 2 h (zur Not aber jedenfalls 1 h) stehen, bevor das Präzipitat abzentrifugiert wird.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hat eine stabilisierende Wirkung auf viele Proteine. Deshalb kann man die Fällung auch über Nacht stehen lassen - das ist sogar besser als jede andere Form der "Übernachtung".

Zum Sedimentieren des gefällten Proteins reicht fast immer eine halbe Stunde bei 6000 rpm im GSA-Rotor (siehe oben). Die Becher müssen alle mit Probe gefüllt sein !! **Nicht mit Wasser austarieren** !! Durch das hohe spez. Gewicht der Salzlösung ergäbe dies unterschiedliche Füllhöhen und somit eine starke Unwucht.

Die Pellets lassen sich meist gut in relativ wenig Puffer auflösen. Die Probe enthält dann aber noch beträchtliche Mengen an Salz. Vor Ionentausch also dialysieren (oder Gelfiltration, ist aber für Sie aufwendiger).

## Proteinbestimmung

Es gibt drei wesentliche Methoden um die Proteinkonzentration einer Lösung halbwegs verlässlich zu bestimmen. Die Messung der UV-Extinktion gehört nicht dazu.

Kurzbezeichnung:	Vorteil	NT	Störungen
<b>Bradford</b>	einfach	ungenau	Detergentien
Lowry	genau	zeitabhängig	reduzierende Substanzen (Zucker), Amine etc.
BCA (Bicinchoninsäure)	genau		reduzierende Substanzen (Zucker), Amine etc.

Bei allen Bestimmungen taucht das Problem auf, daß verschiedene Proteine nicht die gleiche Farbausbeute ergeben (Bsp: BSA = 100 %, Ovalbumin 49 % bei Bradford). Daher ist es wichtig anzugeben, auf welchen Standard man die Berechnung bezieht. Dadurch wird die Bestimmung nicht richtiger, aber nachvollziehbar.

Den Rest lernen Sie im Proteinbestimmungs-Beispiel.

## **Aktivitätsbestimmung von Enzymen** (1 + 1 = 1.8)

Die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität ist äußerst knifflig. Die gemessenen Werte sind von vielen Parametern wie Temperatur, pH-Wert, Art der Ionen im Medium, Substratkonzentration etc. abhängig. Häufig ist der Zusammenhang zwischen Enzymmenge und Meßwert nur in einem kleinen Bereich halbwegs linear. Wir wollen es aber einfach machen und du kannst innerhalb des Photometer-Meßbereichs (0-1.5) eine lineare Beziehung annehmen (wenn nicht anders angegeben). Du mußt aber sehr oft durch Verdünnung der Probe dafür sorgen, daß Du in diesen Bereich kommst. Praktisch sind hier 1:5 Serien-Verdünnungen, da bei diesem Intervall einer von z.B. 5 Werten sicher im Meßbereich liegt (Das gilt auch für Anderes, wie z.B. Proteinbestimmung) . Diese Verdünnungen mußt Du immer in dem geeigneten Puffer machen.

Zusammengefasst: Wann immer Sie Aktivität bestimmen wollen, zuerst eine Verdünnungsreihe machen und gleich mit ca 4 – 5 Verdünnungen die Bestimmungen ansetzen.

hier ist jetzt einmal Schluß, das sollte aber nicht so sein und wird sich bald ändern !

## **pH-Meter**

Es gibt im Bio-Labor zwei pH Meter zur freien Auswahl. Die Messung an sich ist trivial und Sie sollten nur daran denken, dass die Messlösung leicht gerührt (oder die Elektrode vorsichtig bewegt) werden soll.

Es empfiehlt sich bei beiden Geräten, die Kalibration mit dem bereitgestellten pH 7 Puffer zu überprüfen. Sollte Sie ein Zehntel oder mehr falsch sein, kalibrieren sie das pH-Meter.

Beim WTW Gerät: zuerst mit pH 7 Puffer mit dem Knopf „buffer adjust“ einstellen  
dann mit pH 4 Puffer und dem Knopf „asymmetry“.

(Sie sollten hierfür die Puffer OHNE der Aufschrift WTW verwenden)

Beim Inolab – Gerät (ein Lehrbeispiel für intuitive Benutzerführung):

Elektrode in pH 7.00 Puffer (WTW-Puffer !) tauchen (leicht bewegen)

solange auf CAL drücken, bis unten „Autocal“ steht.

dann RUN/ENTER

warten bis Anzeige AR zu blinken aufhört und CE2 erscheint

Elektrode in pH 4.00 Puffer tauchen

wieder RUN/ENTER

warten ....

“M“ drücken, fertig.