

Pauler, B., Imani, J. u. K.-H. Neumann
Institut für Pflanzenernährung der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Praktikum biochemischer,
radiobiochemischer und
gentechnischer Methoden

Für Studenten
der Ernährungswissenschaften,
der Agrarwissenschaften und der Biologie

Vorwort

Das hier vorgelegte Praktikumsbuch ist das Ergebnis einer über viele Jahre hinweg sich entwickelnden Erfahrung in der Durchführung von Praktika, durch die Studenten in die biochemische Laborarbeit eingeführt werden sollen. Während in den ersten beiden Teilen biochemisches Grundwissen vermittelt wird, besteht das Ziel des dritten Teils, der Einführung in gentechnische Verfahren, darin, molekularbiologisch/biochemisches Wissen und Können auf eine bestimmte Zielsetzung hin anzuwenden. Die beiden ersten Teile des Praktikums werden mit maximal 40 Studenten durchgeführt, der dritte Teil ist auf 12 bis 15 Studenten, allein aus Platzgründen in unserem Institut, beschränkt. Der gentechnologische Teil kann nur von Studenten wahrgenommen werden, die die ersten beiden Teile, die für das 5. und 6. Semester vorgesehen sind, erfolgreich absolviert haben.

Es soll darauf hingewiesen werden, daß sowohl für den radiochemischen, als auch für den gentechnischen Teil des Praktikums behördliche Genehmigungen erforderlich sind. Auf Sicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit radioaktiven Isotopen wird an verschiedenen Stellen im radiochemischen Teil des Buches eingegangen, als Beispiel für Sicherheitsbestimmungen im Gentechniklabor ist im Anhang als Beispiel die Betriebsanleitung für unser Labor hier in Gießen beigelegt.

Die hier beschriebenen Methoden dienen als Beispiele für verschiedene, heute in der biochemischen Laborarbeit gebräuchliche Verfahren, wobei sich deren Auswahl an den Forschungsarbeiten des Institutes ausgerichtet hat. Sowohl für die Beschreibung der Versuche, als auch für die Organisation der Versuchsdurchführung im Praktikum waren die regelmäßige Auswertung der für die einzelnen Praktikumsabschnitte durchgeführten Kolloquien und vor allem auch die Anregungen, die sich als Ergebnisse von Diskussionen mit Absolventen ergaben. Die meisten Versuche erfordern quantitatives Arbeiten. In dem einen oder anderen Falle wurden auch ältere, heute durch modernere Versuchsanordnungen ersetzte Methoden herangezogen. Diese würde man nur noch in Labors mit einer sehr begrenzten Geräteausstattung verwenden. Diese älteren Verfahren wie z.B. die Papierchromatographie dienen jedoch einem sehr viel besseren Verständnis des methodischen Prinzips der Chromatographie als ein hochtechnisches Gerät, dem der Student lediglich die zu untersuchende Probe appliziert und dann vom Computer das fertig ausgerechnete Ergebnis erhält, wie dies bei den gaschromatografischen Verfahren dann der Fall ist.

Ein Praktikum mit der Zielsetzung, Studenten in die Grundzüge quantitativen biochemischen Arbeitens einzuführen, wird immer ein Kompromiß aus dem zeitlichen Rahmen des Studienplanes, den materiellen Ressourcen des durchführenden Institutes und den wissenschaftlichen Prioritäten des für die Durchführung verantwortlichen Dozenten sein. Wir hoffen, daß der für uns in Gießen gefundene Kompromiß auch anderen Kollegen eine Anregung sein kann. Über kritische Anregungen würden wir uns freuen.

Das Manuskript ist ursprünglich (1998) für die praktische Durchführung des Praktikums in Buchform in einem hauptsächlich auf Doktorarbeiten u.ä. spezialisierten Verlag erschienen (ISBN 3-8265-4193-6). Um es einem breiteren Publikum zugänglich zu machen, haben wir jetzt die Herausgabe in der elektronischen Bibliothek unserer Universität gewählt. Insbesondere der Abschnitt über die Gentechnik, aber auch andere, wurden dabei gründlich überarbeitet und dem heutigen Stand angepaßt.

Gießen, im Dezember 2003

B. Pauler

J. Imani

K.-H. Neumann

<mailto: Bruno.H.Pauler@ernaehrung.uni-giessen.de>
[jafargholi.imani@ernaehrung.uni-giessen.de](mailto: jafargholi.imani@ernaehrung.uni-giessen.de)
[Karl-Hermann.Neumann@ernaehrung.uni-giessen.de](mailto: Karl-Hermann.Neumann@ernaehrung.uni-giessen.de)

	<u>Seite</u>
<u>A) Einleitung zu: I) Chromatografische Verfahren und Enzym-Analytik</u>	1
1.) Prinzip chromatografischer Verfahren	1
1.1) Chromatografische Arbeitsverfahren	2
1.2) Papierchromatografie	2
1.3) Säulenchromatografie	3
1.4) Dünnschichtchromatografie	3
1.5) Elektrophorese	3
1.6) Gaschromatografie	4
2.) Enzymuntersuchungen	5
<u>B) Einleitung zu: II) Radiobiochemische Versuche</u>	5
<u>C) Einleitung zu: III) Gentechnische Verfahren</u>	6
<u>Praktikumsteile I (Chromatografische Verfahren und Enzym-Analytik) und II (Radiobiochemie)</u>	7
<u>Versuchs- und Zeitplan zu I und II</u>	9
<u>I) Versuche zu chromatografischen Verfahren und Enzymanalytik</u>	
Versuch 1: Ionenaustauschchromatografie	13
Versuch 2: Spezifische Enzymaktivität der α -Amylase	17
Einführung in die Gaschromatografie (zu Versuch 3 und 13)	25
Versuch 3: Gaschromatografie (Allgemein)	31
Versuch 4: Dünnschichtchromatografie	37
Versuch 5: Papierchromatografie	41
Versuch 6: Sephadex-Gelfiltration	45
Versuch 7: Enzymkinetik	57
Versuch 8: Auswertung der Papierchromatografie	77
Versuch 9: Enzymatische Zuckerbestimmung	85
Einführung in die Elektrophorese (zu Versuch 10 und 11)	91
Versuch 10: Elektrophorese (natives Protein)	105
Versuch 11: Elektrophorese (denaturiertes Protein)	113
Versuch 12: ELISA (<u>E</u> zyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbend <u>A</u> ssay)	119
Versuch 13: Alkoholbestimmung mittels Gaschromatografie	125

<u>II) Versuche zur Radiobiochemie</u>	<u>Seite</u>
Versuch 14: Demonstration radiochemischer Messungen	129
Versuch 15: Liquid Scintillation Counting (Ausbeute)	145
Versuch 16: Radioscanner	155
Versuch 17: γ -Spektroskopie	161
<u>III) Gentechnische Verfahren</u>	
<u>Versuchs- und Zeitplan zu III</u>	171
Versuch 18: Gewinnung von Zellsuspensionen	173
Versuch 19: Transformation in E. coli zur Plasmidvermehrung	183
Versuch 20: Konjugation	189
Versuch 21: Transformation pflanzlicher Zellen	199
Versuch 22: Nachweis des Fremdgens (GUS-Nachweis, PCR, Southern Blot)	205
<u>Literatur zu III</u>	231
<u>Anhang</u>	235

A) Einleitung zu: I) Chromatografische Verfahren und Enzymanalytik

1.) Das Prinzip chromatografischer Verfahren

Das analytische Verfahren der Chromatografie geht auf die Arbeiten des Russen TSWETT zurück, der zu Anfang des Jahrhunderts eine Adsorptionsmethode zur Trennung pflanzlicher Farbstoffe entwickelte.

Diese Trennung wurde wie folgt durchgeführt: Ein Petroläther-Extrakt pflanzlicher Pigmente wurde auf ein mit feinpulverisiertem CaCO_3 gefülltes, senkrecht stehendes Glasrohr, eine „Säule“, aufgebracht. Zunächst wurden die Pigmente im oberen Teil des Säulenfüllmaterials sorbiert. Durch die weitere Zugabe von reinem Petroläther zur Säule verbreiterte sich die sorbierte Farbzone so weit, daß schließlich mehrere gelbe und zwei grüne Farbzonen unterschieden werden konnten. Nach den am Adsorbens gebildeten Farbzonen nannte TSWETT sein Verfahren "Chromatografie".

Bei jeder chromatografischen Trennung ist ein Zwei-Phasen-System erforderlich, das aus einer stationären (z.B. CaCO_3) und einer mobilen Phase (z.B. Petroläther) besteht. Die Chromatographie, also die Trennung eines Probengemisches in einzelne Komponenten, erfolgt dadurch, daß sich einzelne Probenkomponenten in dem Zwei-Phasen-System unterschiedlich verhalten, d.h. eine größere oder geringere Affinität zu einer der beiden Phasen aufweisen. Der Verteilungskoeffizient

$\alpha = \frac{\text{Konz. (stationäre Phase)}}{\text{Konz. (mobile Phase)}}$ ist bei jedem chromatografischen Verfahren der

entscheidende Faktor für die Trennung einzelner Substanzen eines Probengemisches. Die stationäre Phase kann auch spezielle chemische oder physikochemische Besonderheiten aufweisen, die mit bestimmten Stoffklassen während der Chromatografie selektiv in Wechselwirkung treten (z.B. Adsorption, Absorption oder Ionenaustausch, einzeln oder auch in Kombination). Es hat sich eingebürgert, das chromatografische Verfahren nach diesen Spezialeffekten zu benennen: Adsorptions-, Ionenaustausch-, Molekularsieb-Chromatografie etc.

Beispielhaft soll die Adsorptionschromatografie im folgenden näher erläutert werden. Seit TSWETT wurde dieses Verfahren in den zwanziger und dreißiger Jahren weiter vervollkommnet und schließlich auch auf nicht-gefärbte Stoffe übertragen. Daß heute die Chromatografie eine so wichtige Rolle für die biochemische Analytik spielt, war jedoch erst durch Einführung der Papier-Chromatografie durch CONSDEN, GORDON und MARTIN in den vierziger Jahren möglich.

Zur Adsorptions-Chromatografie verwendet werden verschiedene, für die jeweiligen Trennaufgaben besonders geeignete Adsorbentien, die ggf. vorbehandelt sein können (vorwiegend Aluminiumoxid, aber auch z.B. Puderzucker, Kieselgur und andere stark oberflächenaktive Stoffe), die, oftmals in einer bestimmten Reihenfolge übereinander geschichtet, in Pulverform in ein senkrecht stehendes Glasrohr eingefüllt werden. Das in einem geeigneten Lösungsmittel, das auch Komponenten für die sta-

tionäre Phase enthalten kann (z.B. Wasser - s.a. Papier-Chromatografie) gelöste Substanzgemisch läßt man durch das befüllte "Chromatografierohr" von oben her, gegebenenfalls unter Druck- oder Sogwirkung, die Säule passieren. Die Substanz mit der höchsten Affinität zum Adsorbens wird dabei in der obersten Zone des Säulenfüllmaterials adsorbiert. Auf diese folgen dann, entsprechend unterschiedlich hoher Affinität zum Adsorbens, die übrigen Probenkomponenten. Die dabei entstehenden Zonen oder „Banden“ werden in geeigneter Weise, gegebenenfalls durch Anfärbung, soweit die Substanzen keine Eigenfärbung aufweisen, identifiziert.

Werden in einer Säule verschiedene Adsorbentien schichtweise verwendet (s.o.), so wiederholt sich bei jeder Adsorbens-Schicht diese Zonenbildung entsprechend der Adsorbensaffinität (s. Verteilungskoeffizient!) der verschiedenen Stoffe, wodurch sich scharfe Trenneffekte erzielen lassen.

1.1) Chromatografische Arbeitsverfahren

Auf dem unter Punkt 1) beschriebenen Grundprinzip der Chromatografie beruhen alle heute gebräuchlichen chromatografischen Methoden. Man unterscheidet, entsprechend ihrer praktischen Durchführung, im wesentlichen folgende Arbeitsverfahren:

- a) Papierchromatografie;
- b) Säulenchromatografie:
 - Austauscher-Chromatografie;
 - HPLC;
 - Gelfiltration (Molekularsieb-Chromatografie);
- c) Dünnschichtchromatografie;
- d) Gaschromatografie.
- e) Elektrophorese

1.2) Papierchromatografie (PC)

Bei der PC dient Filterpapier als Träger für die wässrige stationäre Phase. Das „Laufmittel“ besteht dabei aus der mobilen Phase und einem Wasseranteil, der bei „aufsteigender“ PC nach erfolgter Diffusion des Laufmittels im Papier mit Cellulose die stationäre Phase bildet. In den unendlich vielen kleinen durch die Micellen des Papiers gebildeten Elementarzellen finden quasi aufeinanderfolgende "Ausschüttelungen" der Substanzen im Zwei-Phasen-System statt. Diese führen schließlich zur gewünschten Trennung. Am Papier können jedoch oftmals auch Adsorptions- oder Austausch-Vorgänge bei der Trennung mitwirken.

1.3) Säulenchromatografie

Unter der Bezeichnung „Säulenchromatografie“ wird eine Reihe von Arbeitsverfahren zusammengefaßt, die unter Verwendung spezieller Trägerstoffe mit Adsorptions-, Absorptions- (z.B. das mit sogenannten Molekular-Siebeeigenschaften wirkende Sephadex) oder Ionenaustausch-Eigenschaften in einem senkrecht stehenden „Chromatografierohr“ (einer „Säule“) (s.o.) ablaufen. Ionenchromatografie und HPLC (= High Performance Liquid Chromatography) sind prominente Vertreter dieser Chromatografiegruppe.

Während bei der klassischen Adsorptionschromatografie nur die Oberflächen-Bindungskräfte des Füllmaterials zur Trennung führen, wirken z.B. bei der Austausch-Chromatografie, meistens mit Kunstharz als Säulenfüllmaterial, zusätzlich stark pH-abhängige elektrochemische Kräfte. Es kommt somit zu einer direkten chemischen Reaktion zwischen den zu trennenden Substanzen und der speziellen Trägersubstanz. Dabei tritt ein Austausch von Anionen oder Kationen (entsprechend der Ladung des verwendeten Füllmaterials) mit dem Trägermaterial ein, wodurch eine Anreicherung der einen oder anderen Substanz an der stationären Phase erzielt werden kann.

1.4) Dünnschichtchromatografie (DC)

Je nach der verwendeten Trägersubstanz kommen auch bei der Dünnschichtchromatografie Verteilungs-, Adsorptions- oder Austauscheffekte zur Wirkung, so daß man die DC gewissermaßen als "offene Chromatographiesäule" bezeichnen kann. Die meist verwendeten Trägersubstanzen für die stationäre Phase sind Kieselgel, Aluminiumoxid oder auch Austauschermaterialien, also elektrochemisch geladene Kunstharze wie bei der Austausch-Chromatografie, die auf Glasplatten oder z.B. auf dünner Kunststoff- oder Alufolie aufgebracht sind. Die DC bildet eine wertvolle Ergänzung zur Säulen- und Papierchromatografie vor allem für qualitative Untersuchungszwecke im Labor. Ihr Vorteil liegt darin, daß eine verhältnismäßig scharfe Trennung des zu untersuchenden Substanzgemisches in relativ kurzer Zeit erzielt werden kann. Außerdem können sowohl aggressive Laufmittel-Gemische als auch aggressive Sprüh-Reagenzien zum Nachweis und zur Identifizierung der getrennten Substanzen herangezogen werden, was bei der Papierchromatografie nicht möglich ist.

1.5) Elektrophorese

Hochmolekulare biologische Substanzen, wie z.B. Proteingemische oder Nukleinsäure-Fractionen, lassen sich mit Hilfe der Elektrophorese trennen. Aber auch zur Sepa-

ration von niedermolekularen Stoffklassen, wie z.B. Aminosäuren u.a., kann oft die Elektrophorese als Ergänzung zur Papierchromatografie verwendet werden.

Bei der Elektrophorese erfolgt der Transport von Molekülen auf einem gepufferten Papierstreifen oder in organischen Gelen im elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung zur Anode oder Kathode. Die an Elektroden angelegten Spannungen betragen 110 oder 220 Volt, bei der Hochspannungs-Elektrophorese sogar bis 10000 Volt und mehr, während die Stromstärke des elektrischen Feldes auf etwa 0.5 bis 1.0 Milliampere gehalten wird.

Die Elektrophorese wird wie die Papierchromatografie in einem geschlossenen Gefäß durchgeführt. Die Verwendung verschiedener Puffer führt zu einer breiten Anwendungsmöglichkeit dieses Verfahrens.

Neben der Papier-Elektrophorese, bei der, wie der Name schon sagt, Papier als Trägermaterial verwendet wird, sind heute auch Elektrophorese-Verfahren bekannt, bei denen andere Trägerstoffe (Polyacrylamid-Gel, Sepharose, Stärke, Agarose etc.) mit Vorteil verwendet werden. Das Prinzip ist jedoch bei all diesen Methoden etwa gleich.

Von den neueren Verfahren soll nur noch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erwähnt werden. Hierbei dient Polyacrylamid als Träger. Ähnlich wie Sephadex stellt Polyacrylamidgel eine Art Netzwerk dar, in dem analog dem Trenneffekt bei Sephadex zusätzlich zur Trennung nach der elektrochemischen Ladung von Makromolekülen die Auftrennung in einzelne Komponenten nach Molekülgröße erfolgt. Mit diesem Verfahren ist eine sehr viel bessere Auftrennung von z.B. Proteinfractionen möglich als mit der herkömmlichen Papier-Elektrophorese. Während z.B. das Albumin bei der Niederspannungs-Papier-Elektrophorese nur als eine einzige Fraktion in Erscheinung tritt, kann es mit der eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese je nach seiner Herkunft in 5 bis 8 Unterfraktionen aufgetrennt werden. Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese, bei der durch Verwendung von Ampholyten noch Unterschiede nach dem isoelektrischen Punkt der einzelnen Proteine ausgenutzt werden, sind einige Hundert bis mehrere Tausend Proteinarten nachweisbar.

1.6) Gaschromatografie (GC)

Bei der GC werden Gase oder auch Flüssigkeiten mit Siedepunkten bis etwa 350°C in Form von Dämpfen in einem längeren Chromatografie-Rohr (2-6m, bei Kapillar-GC auch noch länger) entweder an Feststoffen mit großer innerer Oberfläche oder an mit einer Trägerflüssigkeit (z.B. Polyethylenglycol (PEG)) getränktem Trägermaterial (z.B. Celite = Kieselgur) als stationärer Phase getrennt, wobei Gase (z.B. N₂, He-

lium oder Argon) als mobile Phase dienen. In Abhängigkeit vom Säulenfüllmaterial als stationärer Phase wird die GC-Säule bis auf 350°C beheizt. Bei Verwendung von Celite als Trägermaterial für PEG kann jedoch z.B. nur bis 140°C beheizt werden.

Die verwendete Arbeitstemperatur richtet sich nach der Beschaffenheit der zu trennenden Stoffe und der zu verwendenden stationären Phase. Die aus der GC-Säule austretenden Gase werden aufgrund ihrer verschiedenen physikalischen Eigenschaften (z.B. spezifische Wärmeleitfähigkeit oder elektrische Leitfähigkeit) in entsprechenden Detektoren gemessen und registriert.

Die Substanzen als stationäre Phase sollen einen hohen Siedepunkt (>400°C) und einen niedrigen Dampfdruck aufweisen. Die Gaschromatografie wird verwendet z.B. zur Trennung und Analyse pflanzlicher Aromastoffe oder, nach deren Veresterung, von höhermolekularen Fettsäuren, niedermolekularen Kohlenhydraten, Aminosäuren usw.

2.) Enzymuntersuchungen

Enzymuntersuchungen werden in der Biochemie in großem Umfang durchgeführt. Zum einen sind Enzyme in sogenannten Enzym-Testsätzen gewissermaßen Reagenzien, mit deren Hilfe eine große Zahl wichtiger Metaboliten relativ einfach quantitativ zu bestimmen sind (s. **Versuch 9**). Zum anderen besteht die Notwendigkeit, Enzyme, die an wichtigen Stoffwechselwegen beteiligt sind, im Hinblick auf Aktivität und Kinetik näher zu charakterisieren (s. **Versuche 2 u. 7**). In diesem Zusammenhang sei an die Bedeutung intensiv untersuchter Leitenzyme für die moderne medizinische Diagnostik erinnert.

B) Einleitung zu: II) Radiobiochemische Versuche

Da radioaktive Nuklide eines Elementes generell in chemischer und biologischer Hinsicht gleiches Verhalten wie stabile Nuklide des gleichen Elementes aufweisen, eignen sich Radionuklide aufgrund ihrer Strahlung besonders gut zur Markierung bestimmter Elemente oder Verbindungen in biochemischen Untersuchungen.

In Anbetracht der heute existierenden sehr empfindlichen Nachweismethoden für Radionuklide, die oftmals auch den Vorteil einer sehr vereinfachten Durchführbarkeit im Vergleich zu herkömmliche Untersuchungsverfahren aufweisen, und wegen der Möglichkeit, zwischen zugefügten und bereits vorhandenen Stoffen in einem System unterscheiden zu können, ist die sogenannte "Tracer"-Technik zu einem unentbehrlichen methodischen Hilfsmittel in der biologischen Forschung geworden.

Einige Beispiele sollen die Vorteile der Tracer-Technik verdeutlichen (s. z.B. Versuch 2):

- a) Markierung physiologisch interessanter Verbindungen und die Beobachtung im Verlauf des Stoffwechsels (Aufklärung von Stoffwechselwegen);
- b) Bestimmung biologischer "Halbwertszeiten" oder der Verweildauer eines Stoffes im Organismus;
- c) Nachweis kleinster Stoffmengen über deren Radioaktivität, z.T. auch ohne Zerstörung des Untersuchungsobjekts.

C) Gentechnologische Methoden

Die sich gegenwärtig in der Entwicklung befindenden und von vielen Arbeitsgruppen intensiv bearbeiteten und auch schon vielfach in die Praxis eingeführten gentechnologischen Methoden sollen einer gezielten, mit der Veränderung bestimmter Merkmale verbundenen, Beeinflussung des Genoms dienen. Obwohl solche Genomveränderungen grundsätzlich auch an Gameten an der intakten Pflanze oder an Apexzellen mit anschließender Bewurzelung der davon gewonnenen Stecklinge vorgenommen werden können, sind bis heute Zellkulturen mit anschließender Regeneration von Pflanzen das am häufigsten verwendete oder wenigstens angestrebte Zellmaterial für gentechnische Arbeiten mit höheren Pflanzen.

Grundsätzlich stehen heute mehrere Verfahren zur Übertragung und zum Einbau von genetischem Fremdmaterial in zu Pflanzen regenerierbares Zellmaterial auf einem praxisreifen Niveau zur Verfügung. Bei dem einen Verfahren handelt es sich darum, die Fähigkeit von Protoplasten zu nutzen, genetisches Fremdmaterial nach Perkussion ihrer Zellmembranen, meist durch Elektroschock, direkt einzubauen und dann später zu exprimieren. Beim zweiten Verfahren wird dagegen die natürlich in *Agrobacterium tumefaciens* vorhandene Fähigkeit zur Übertragung genetischen Materials mit dessen folgender Expression genutzt. Dieses Verfahren wird im Praktikum durchgeführt. Während im ersten Falle die Verfügbarkeit zu Pflanzen regenerierbarer Protoplasten die Voraussetzung bildet, können im zweiten Falle auch intakte Zellen (auch im Zellverband) durch Fremd-DNS transformiert werden. Dem steht jedoch entgegen, daß bis heute das bakterielle Verfahren mit wenigen Ausnahmen nur auf Dicotyledonen beschränkt ist, während die direkte Übertragung der Fremd-DNA nach Elektroschock beim Protoplastenverfahren prinzipiell auf alle höheren Pflanzen angewendet werden kann. Mit letzterem Verfahren sind die als Nutzpflanzen besonders wichtigen Getreidearten den gentechnologischen Verfahren zugänglich. Bisher hat jedoch das bakterielle Verfahren die größere Anwendung erfahren. Einer breiteren Anwendung des Protoplastenverfahrens stehen heute noch die bei vielen Pflanzenarten, einschließlich der Gramineen vorhandenen Schwierigkeiten entgegen, aus

Zellkulturen intakte Pflanzen heranzuziehen. Schließlich wäre noch das „ Particle Gun „ – Verfahren zu erwähnen, bei dem die zu übertragende DNS auf z.B. kleine Goldkugeln fixiert und so in die Zellen hinein „geschossen“ wird. Dieses Verfahren ist auch bei Monokotyledonen einsetzbar.

Anfangs konnten lediglich bei einigen Pflanzenarten wie z.B. bei Karotten und bei Tabak genetisch transformierte Pflanzen aus Zellkulturen erstellt werden. Die Zahl der Pflanzenarten nimmt jedoch ständig zu. Bei den gentechnischen Verfahren und den großen mit ihnen aufgezeigten Möglichkeiten, mehr oder weniger "maßgeschneiderte" Pflanzenarten herzustellen, darf nicht vergessen werden, daß damit lediglich genetisches "Rohmaterial" gewonnen werden kann, das noch der züchterischen Bearbeitung bedarf, bevor den praktischen Landwirten Saatgut für den Feldanbau zur Verfügung gestellt werden kann. Heute werden jedoch bereits in der Welt, insbesondere in den USA, hunderttausende ha mit gentechnisch bearbeiteten Nutzpflanzen (Mais, Soja u.a.) angebaut.

Praktikumsteile I (Chromatografische Verfahren und Enzym-Analytik) und II (Radiobiochemie)

Organisation

Soweit die theoretischen Grundlagen bei den im folgenden aufgeführten Versuchen und Reaktionen bereits in der Biochemie-Vorlesung besprochen wurden, wird auf deren Abhandlung bei den Versuchsanleitungen verzichtet.

Während einige Versuche jeweils an einem Nachmittag abgeschlossen werden, erstrecken sich manche Versuche (z.B. 1, 3, 5, 8 und 9) z.T. über mehrere Praktikumsstage. Bei der Versuchsvorbereitung sollte dies beachtet werden, damit der Kontext erhalten bleibt.

Bei der praktischen Durchführung der Versuche bilden jeweils acht Studenten eine Arbeitsgruppe, die von einem Betreuer angeleitet wird. Dabei bearbeiten jeweils 2, 4 oder 8 Studenten im „teamwork“ eine Versuchsfrage gleichzeitig, wobei die Konzentrationsstufe der Proben unterschiedlich ist.

Protokollführung:

Über Prinzip, Verlauf und Ergebnis aller Versuche ist von jedem Praktikumssteilnehmer ein Protokoll zu führen. Die Protokolle werden in der Regel

4-6 Wochen nach Abschluß des Praktikums

abgegeben und zur Beurteilung der Praktikumsleistung herangezogen. Dazu kommt noch eine mündliche Prüfung zum Praktikumsstoff. Zu Beginn des folgenden Semesters kann das Protokoll von den Studenten wieder im Institut abgeholt werden.

1. Arbeitstag (s.S. 11)

Versuch 1:

Vortrennung einer aus Aminosäuren (AS) und Zuckern bestehenden Reinsubstanz-Probe mittels Kationen-Austauscher-Säule als Vorbereitung zur anschließenden AS-Chromatografie und zur enzymatischen Untersuchung der quantitativen Zusammensetzung der Zuckerfraktion.

Versuchsziel: Vorreinigung niedermolekularer Stoffgruppen zur anschließenden Chromatografie oder zur quantitativen Bestimmung einzelner Komponenten mittels Enzym-Testsatz.

Versuch 2:

Charakterisierung eines α -Amylase-Präparates im Hinblick auf seine spezifische Enzymaktivität.

- a) Bestimmung des Proteingehaltes;
- b) Bestimmung der Enzymaktivität.

Versuchsziel: Einführung in die Methodik von Proteinbestimmung und enzymatischer Analyse.

Versuch 3:

Einführung in die Gaschromatografie (GC):

Qualitative Untersuchung zum Retentionsverhalten von Substanzen in der Gaschromatografie am Beispiel der homologen Reihe (Methanol; Äthanol; n-Propanol).

Versuchsziel: Einführung in die Gaschromatografie.

2. Arbeitstag (s.S. 37):

Versuch 4:

Qualitative Untersuchung eines Gemisches aus Cholinchlorid und Chlorcholinchlorid (CCC) mittels Dünnschichtchromatografie .

Versuchsziel: . Demonstration der Leistungsfähigkeit der DC bei der Trennung eng verwandter Moleküle bei eindimensionaler Arbeitsweise und gleichzeitig Vorbereitung für die zweidimensionale Papierchromatografie (s. **Versuch 5**).

Versuch 5:

Zweidimensionale Papierchromatografie von Aminosäuren:

Auftragen eines Aliquots der Aminosäure-Fraktion (von Versuch 1) auf Chromatografie-Papier.

Versuchsziel: Vorstellung zweidimensionaler Chromatografieverfahren und einfache Möglichkeiten zu deren quantitativer Auswertung.

Versuch 6:

Sephadex-Gelfiltration zur Trennung nach Molekülgröße am Beispiel einer aus RNA und AMP bestehenden Probe (einschließlich Erstellung von RNA- und AMP-Eichkurven).

Versuchsziel: Einführung in die Säulen-Chromatografie mit Schwerpunkt Molekularsieb-Gelfiltration.

3. Arbeitstag (s.S. 57):**Versuch 7:**

Enzymkinetische Methoden:

Zum Einfluß von pH, Reaktionsdauer und Substrat-Konzentration auf die Enzymaktivität am Beispiel der sauren Phosphatase (aus Kartoffeln) mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat.

Versuchsziel: Charakterisierung eines Enzyms in Hinblick auf:

- a) Enzymaktivität und Reaktionsdauer;
- b) Enzymaktivität und pH-Wert des Mediums;
- c) Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration und Bestimmung von V_{\max} und K_m .

4. Arbeitstag (s. S. 77):**Versuch 8:**

(Fortführung von Versuch 5):

Quantitative Auswertung der zweidimensionalen Papierchromatografie der Aminosäure-Fraktion (von Versuch 1, 1. Arbeitstag).

Versuch 9:

Quantitative Bestimmung der Saccharose- und D-Glucose-Gehalte der Zuckerfraktion (von Versuch 1, 1. Arbeitstag) mittels Enzym-Testsatz.

Versuchsziel: Einführung in die enzymatische Analytik zur Bestimmung von Metaboliten.

Versuch 10:

Elektrophorese eines Präparates der sauren Phosphatase unter „nativen“ Bedingungen mit anschließender Protein- und Enzym-spezifischer Anfärbung der Elektropherogramme.

Versuchsziel: Einführung in die Polyacrylamid-Elektrophorese.

5. Arbeitstag (s.S. 113)

Versuch 11:

SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese eines Präparates der sauren Phosphatase unter reduzierenden Bedingungen zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinfractionen anhand von Molekulargewichts-Standards.

Versuchsziel: Anwendung der Polyacrylamid-Elektrophorese für besondere Trennaufgaben in der Biochemie, z.B. Molekulargewichts-Bestimmung.

Versuch 12:

ELISA-Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/ Oxygenase (=Rubisco)-Konzentration in Blättern.

Versuchsziel: Einführung in immunologische Arbeitsverfahren.

Versuch 13:

Quantitative Bestimmung des Äthanolgehaltes in verschiedenen alkoholischen Getränken mittels Gaschromatografie.

Versuchsziel: Einführung in quantitative Bestimmungsverfahren in der Gaschromatografie.

6. Arbeitstag (s.S. 129)

Versuch 14:

Demonstration radiochemischer Messungen und Auswerteverfahren.

Versuchsziel: Allgemeine Einführung in radiochemische Arbeitsverfahren.

Versuch 15:

Bestimmung der Zählausbeute von ^3H - und ^{14}C -Proben im Flüssig-Scintillationszähler.

Versuchsziel: Messung niederenergetischer β -Strahler bei hoher Zählausbeute mittels Flüssig-Scintillationszähler.

Versuch 16:

Auswertung von Position bzw. Höhe der Radioaktivität markierter Verbindungen in Dünnschicht- bzw. Papier-Chromatogrammen und/oder Elektropherogrammen.

Versuchsziel: Einführung in die Arbeitsweise eines TLC-Radioaktivitätsscanners.

Versuch 17:

Identifizierung und Radioaktivitäts-Bestimmung von γ -Nukliden in Nahrungsmitteln (z.B. getrocknete Pilze, Nüsse, Milchpulver, Tee etc.) mit einem Na(Tl)J- γ -Spektrometer.

Versuchsziel: Einführung in die Arbeitsweise eines γ -Spektrometers mit Vielkanal-Meßeinrichtung.

1. Arbeitstag

Vortrennung einer aus Aminosäuren (AS) und Zuckern bestehenden Reinsubstanz-Probe mittels Kationen-Austauscher-Säule zur anschließenden AS-Chromatografie und zur enzymatischen Bestimmung der Zuckerfraktion.

Versuchsziel: Vortrennung niedermolekularer Stoffgruppen zur anschließenden Chromatografie oder zur quantitativen Bestimmung einzelner Komponenten mittels Enzym-Testsatz.

A) Prinzip:

Austauscher sind durch **Typ**, **Vernetzungsgrad** und **Korngröße** zu charakterisieren. Der Vernetzungsgrad gibt die Anzahl an Querverbindungen zwischen den langgestreckten Kettenmolekülen (meist Kunstharze auf der Basis von Polystyrol) des Austauschers an. Der Vernetzungsgrad beeinflusst die Quellung des Austauschers in wässrigem Medium und bestimmt somit die Durchflußgeschwindigkeit einer Probe durch die Säule und damit die eigentliche Trennung. Die Korngröße bestimmt die aktive Oberfläche des Austauschers (s.o.) und damit die pro Gewichtseinheit austauschbaren Ladungsträger.

(Zur Übung: Man denke sich einen Würfel mit der Kantenlänge 1cm und bestimme seine Oberfläche. Nun teile man diesen Würfel in 1000 Würfelchen mit der Kantenlänge 1mm und vergleiche deren Gesamtoberfläche mit der des Ausgangswürfels)

In diesem Praktikum wird als Austauschermaterial **DOWEX 50 x 4, 100-200 mesh**, verwendet. Die Angabe 100-200 mesh bedeutet eine Korngröße, die durch ein Sieb mit 100-200 Maschen pro inch^2 absiebbar ist, bei einem Vernetzungsgrad von 4.

Von der Austauscher-Säule werden die amphoteren, im sauren Milieu (pH 5.0-5.5) als Kationen vorliegenden Aminosäuren des auf die Säule aufgebrachten Probegemisches (Aminosäuren + Zucker) gebunden. Die elektrochemisch neutralen Zucker verlassen dagegen im Efluat die Austauscher-Säule.

Die Elution der Aminosäuren vom Austausch-Material erfolgt mit einem basischen Elutionsmittel (z.B. 2N NH_4OH), wodurch die amphoteren Aminosäuren in Anionen überführt und somit vom Kationen-Austauscher nicht mehr gebunden werden und mit dem Elutionsmittel die Säule verlassen.

Wirkungsweise von Ionenaustauschern

Der DOWEX-Kationen-Austauscher gehört zu einer Gruppe von Kunstharz-Austauschern mit austauschfähigen SO_3H^- -Gruppen. Der Austauscher ($\text{R-SO}_3\text{H}^+$) kann somit ein H^+ -Ion abdissoziieren, das aber aus Gründen der Elektroneutralität in der Nähe der dissoziierten Gruppe bleibt. Das H^+ -Ion kann sich nur dann entfernen, wenn ein anderes positiv geladenes Ion an seine Stelle tritt und der eigentliche Austausch-Prozeß stattfindet.

Bei der Trennung von Aminosäuren macht man sich deren amphotere Natur zunutze, indem man als H^+ verdrängendes Ion die im sauren pH-Bereich positiv geladene Aminogruppe der Aminosäuren verwendet, wofür vom Kationen-Austauscher H^+ -Ionen abgegeben werden. Durch einen danach aufgebrauchten Überschuss an 2N NH_4OH wird das Säulenmedium alkalisch, wodurch die gebundenen amphoterer Aminosäuren dann als Anionen vorliegen, demzufolge vom Kationen-Austauscher wieder freigesetzt und ausgewaschen werden. Die übrigen nicht-amphoterer anorganischen, aber auch organischen Kationen einer biologischen Probe werden jedoch weiterhin am Austauscher sorbiert. Erst durch einen Überschuß an H^+ -Ionen (1N HCl) werden auch diese freigesetzt und eluiert. Nach Auswaschen überschüssiger HCl durch A. dest. ist der Austauscher wieder "regeneriert" und für neue Versuche einsetzbar.

Bei Anionen-Austauschern (z.B. AMBERLITE IRA 425, 20-50 mesh) ist die funktionelle Gruppe $\text{R-NH}_3^+\text{OH}^-$, wobei das OH^- -Ion gegen anorganische oder organische Anionen (z.B. organische Säuren, R-COO^-) ausgetauscht werden kann. Durch Verwendung eines Überschusses einer relativ starken organischen Säure (z.B. Ameisensäure) können auf diese Art gebundene Anionen wieder freigesetzt werden, indem z.B. Formiat-Ionen die Säurereste der sorbierten organischen Säuren verdrängen.

Die Ionenaustauscher-Chromatografie wird meist unter Verwendung geeigneter Puffersysteme als Elutionsmittel auch zur Fraktionierung von geladenen Stoffgruppen verwendet. Sehr bekannt ist die Auftrennung von biologischen Aminosäure-Gemischen unter quantitativer Bestimmung einzelner Aminosäuren. Wie stark eine Aminosäure vom Ionenaustauscher gebunden wird, hängt von deren Ionisationszustand ab, d.h. von der Dissoziationskonstanten der funktionellen Gruppen der einzelnen Aminosäuren, und vom pH-Wert des Elutionsmittels. Man nutzt also zur Trennung einzelner Aminosäuren durch die Verwendung verschiedener Puffer als Elutionsmittel, eventuell auch als pH-Gradient, die an sich geringen Unterschiede in der Ionisation der funktionellen Gruppen von Aminosäuren aus. Die aus der Austauscher-Säule eluierten Aminosäuren werden angefärbt (z.B. mit Ninhydrin, s.u.) und kolorimetrisch quantitativ bestimmt. Auf der Grundlage dieser Säulen-Ionenaustausch-Chromatografie wurden vollautomatische Methoden zur quantitativen Aminosäure-Bestimmung entwickelt.

Will man, wie in unserem Fall, eine Stoffgruppe (Aminosäuren) mittels Papierchromatografie trennen, stören z.B. stark hydrophile Substanzen wie Zucker oder andere Polyhydroxy-Verbindungen bei der geplanten Chromatografie. Würde man die Zucker vor der Chromatografie nicht entfernen, hätte dies eine sehr schlechte Trennung der Aminosäuren zur Folge.

Auch bei der Aufarbeitung biologischer Extrakte zur anschließenden Chromatografie von Aminosäuren wird das Verfahren der Kationen-Austauschtrennung zur Vorreinigung der Aminosäure-Fraktion verwendet.

B) Material

- a) Reinsubstanz-Probe (5 Aminosäuren + 2 Zucker) mit gestufter Konzentration;
- b) Kationen-Austauscher (DOWEX 50 x 4, 100-200 mesh) in einer Glassäule;
- c) 1N HCl;
- d) 2N NH₄OH;
- e) zwei 400ml-Bechergläser.

C) Versuchsdurchführung

- a) Die Austauscher-Säule **darf unter keinen Umständen trockenlaufen!** Luftblasen in der Säule würden an diesen Stellen den Zugang an die austauschfähigen Gruppen ausschließen, wodurch man mit Substanzverlusten und einem schlechten Trenneffekt rechnen müßte!
- b) Die Reinsubstanz-Probe (a) quantitativ in den Trichter der bereitstehenden Kationen-Austauscher-Säule (b) überführen. Den Säulenauslauf öffnen und das Efluat in einem mit dem Namen und "Zucker" markierten 400ml-Becherglas (e) mit einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 20 Tropfen/Min. sammeln.
- c) Wenn die Probe gerade in die Oberfläche des Kationen-Austauschers eingedrungen ist, A. dest. vom Nachwaschen des Probenglases auf die Säule aufbringen, ohne daß in die Austauscher-Säule Luft eindringen kann.
- d) Wenn der Säulentrichter wieder leergelaufen ist, das Nachspülen des Probengefäßes und das Aufbringen auf die Säule noch zweimal wiederholen.
- e) Ist das Nachspülen des Probengefäßes abgeschlossen, und das Nachspülwasser gerade wieder in die Oberfläche des Austauschers eingesickert, wird **mit kleinen Portionen** A. dest. der Säulentrichter mehrmals nachgespült, wobei man zwischen den Nachspülvorgängen wiederum die Flüssigkeit in die Säule hat einsickern lassen.

(Wird das Nachspülen ohne vorheriges Einsickern des vorherigen Spülwassers in die Säule durchgeführt, erzielt man eine permanente Verschleppung von Probenbestandteilen infolge kontinuierlicher Verdünnung und letztendlich eine unzureichende Trennung der beiden Stoffgruppen Aminosäuren und Zucker!)

- f) Nun wird der Kationen-Austauscher mit ca. 50ml A. dest. neutral gewaschen, da durch Umtausch von H^+ gegen Aminosäuren H^+ -Ionen im Efluat austreten. Ist die Säule neutral (**mit Indikator-Papier testen!**), ist anzunehmen, daß auch die Zuckermoleküle die Säule verlassen haben.
- g) Die Zucker-Fraktion wird von den Betreuern der Arbeitsgruppen im Trockenschrank bei $50^\circ C$ zur Trockne eingeeengt (bei höherer Temperatur würden Zucker karamelisieren!).
- h) Nachdem nun die Zucker-Fraktion erfaßt ist, können die amphoteren Aminosäuren durch Zugabe von 2N NH_4OH als Anionen vom Kationen-Austauscher abgelöst und eluiert werden:
- i) Hierzu wird ein mit dem Namen und "AS" gekennzeichnetes 400ml-Becherglas unter die Säule gestellt und die Aminosäure-Fraktion mit ca. 60ml 2N NH_4OH eluiert. Da dieser Vorgang oft längere Zeit in Anspruch nimmt, kann auch ein 100ml-Kölbchen mit 60-70ml 2N NH_4OH vorsichtig in den Säulentrichter der Austauschersäule, der mit genügend 2N NH_4OH gefüllt sein muß, gestülpt werden. Dadurch ist die AS-Elution über Nacht, ohne Anwesenheit der Praktikanten, möglich.
- j) Ist die AS-Elution beendet, wird die AS-Fraktion in einem weiteren Trockenschrank bei $55^\circ C$ zur Trockne eingeeengt.
- k) Das Regenerieren der Kationen-Austauscher durch Neutralwaschen und Behandlung mit 1N HCl wird vom Betreuer im Institut durchgeführt.

D) Auswertung

Bei diesem Versuch erfolgt zunächst keine weitere Auswertung. Während die Aminosäure-Fraktion im **Versuch 5** (2. AT) mittels zweidimensionaler Papierchromatografie in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt und danach die einzelnen Aminosäuren in **Versuch 8** (4. AT) quantitativ bestimmt werden, erfolgt die quantitative Bestimmung von Saccharose und D-Glucose in der Zucker-Fraktion in **Versuch 9** (4. AT).

1. Arbeitstag

Charakterisierung eines α -Amylase-Präparates im Hinblick auf seine spezifische Enzymaktivität.

- a) Bestimmung des Proteingehaltes;
- b) Bestimmung der Enzymaktivität.

Versuchsziel: Einführung in die Methodik von Proteinbestimmung und enzymatischer Analyse.

A) Prinzip:

Will man die Aktivität eines Enzyms charakterisieren, so genügt oft nicht nur die eigentliche Aktivitätsbestimmung, sondern man möchte auch wissen, wieviel Enzymprotein die enzymatische Umsetzung bewerkstelligt. Bezieht man die Enzymaktivität auf die Menge an Enzymprotein, so erhält man die sogenannte "spezifische Enzymaktivität", welche die Leistungsfähigkeit eines Enzympräparates besser als die alleinige Bestimmung der Enzymaktivität charakterisieren kann.

Die Aussage der spezifischen Enzymaktivität ist etwa zu vergleichen mit der Produktion einer Autofirma, die pro Woche z.B. 50 PKWs herstellt. Will man die Leistungsfähigkeit dieser Firma im Vergleich mit einer anderen Firma mit gleicher Wochenleistung näher untersuchen, interessiert z.B. die Anzahl Arbeitskräfte (oder die Menge an Produktionskapital etc.), die am Produktionsprozess beteiligt sind. Haben bei der ersten Firma z.B. 100 Arbeitskräfte, bei der zweiten aber nur 50 an der Produktion mitgewirkt, so ist die zweite Firma (bei gleicher Wochen-Produktion) sehr viel effizienter einzuschätzen als erstere, denn pro Arbeitskraft wurden von Firma 1 $50/100 = 0.5$ Autos/Arbeiter, von Firma 2 aber $50/50 = 1$ Auto/Arbeiter produziert.

Nun aber wieder zurück zur spezifischen Enzymaktivität! Sie wird errechnet, indem der Substrat-Umsatz eines Enzyms (z.B. $50 \mu\text{Mol}/10 \text{ Min.}$ in 1 ml Ansatz) auf die Proteinmenge (z.B. $100 \mu\text{g}$ in 1 ml Ansatz) bezogen wird. Sie errechnet sich in dem gegebenen Beispiel:

$\underline{\text{spezifische Enzym-Akt.}} = \frac{5 \mu\text{Mol Produkt/Min. pro ml}}{100 \mu\text{g Protein pro ml}}$
--

Für den Enzym-Umsatz gibt es eine internationale Einheit, das "Unit"¹⁾, abgekürzt „U“. Ein Unit ist der enzymatisch katalysierte Substrat-Umsatz in μMol pro Minute. Die obige Gleichung ist daher auch in Units auszudrücken:

$$\text{spezifische Enzymaktivität} = \frac{5 \text{ U pro ml}}{100 \mu\text{g Protein pro ml}}$$

oder:

$$\text{spezifische Enzymaktivität} = \frac{5 \text{ U}}{100 \mu\text{g}} = \underline{\underline{0.05 \text{ U}/\mu\text{g Protein}}}$$

Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität benötigt man daher sowohl die Bestimmung der Enzymaktivität als auch der des Proteingehaltes im Enzympräparat.

Prinzip der Bestimmung der Enzymaktivität

Man inkubiert ein Enzympräparat unter optimalen, genau definierten Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke des Puffersystems, geeignete Substratkonzentration, Temperatur, Zeit und gegebenenfalls Effektorenkonzentration) und bestimmt nach Abstoppen der Enzymreaktion entweder das verbliebene Substrat oder das gebildete Produkt.

In unserem Falle versetzt man α -Amylase in Phosphat-Citrat-Puffer (pH 6.9) mit Stärkelösung als Substrat, inkubiert 10 Minuten bei 30°C im Thermostat, stoppt die Enzymreaktion durch Erhitzen auf 100°C im Wasserbad ab und bestimmt danach den Gehalt an Maltose als Produkt im Testansatz nach Zugabe von 2ml Dinitrosalizylsäure photometrisch gegen einen Blindwert.

¹⁾ Die neue Einheit für die Enzymaktivität ist das **Katal**. Sie ist definiert als der Substrat-Umsatz eines Enzyms in Mol/Sekunde. Da aber die Einheit **Unit** auch noch üblich ist, wenden wir sie auch in diesem Praktikum an.

Prinzip der Bestimmung des Gehaltes an Enzymprotein

Es gibt zahlreiche Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Hier wird die Methode nach **LOWRY** verwendet, die eine Erweiterung der bekannten „**Biuret**“-Methode darstellt. Letztere war eines der ersten kolorimetrischen Arbeitsverfahren zur Proteinbestimmung und ist auch heute noch im Einsatz, wenn es auf eine schnelle, aber nur grobe Proteinbestimmung ankommt. Die Reaktion beruht auf einer Komplexierung von Kupferionen mit den Peptidbindungen von Proteinen und Tyrosin-Resten in alkalischer Lösung. Die Bestandteile des Ansatzes für die Biuret-Methode sind Cu(II)-Sulfat in Na-K-Tartrat-Lösung und NaOH.

Die LOWRY- oder auch **Folin-Ciocalteu-Phenol**-Methode zur Proteinbestimmung basiert zunächst ebenfalls auf einer Komplexierung von Cu-Ionen mit Proteinen im alkalischen Bereich. Der Cu-Protein-Komplex reduziert dann das aus Phosphomolybdat und Phosphowolframat bestehende **Folin-(Ciocalteu-Phenol)-Reagens**, woraus eine intensiv blaue Färbung resultiert. Die LOWRY-Methode ist etwa um den Faktor 20 empfindlicher als die Biuret-Methode, allerdings etwas zeitaufwendiger.

Bei Zugabe des Folin-Reagens ist es ganz wichtig, darauf zu achten, daß die Probe sofort nach der Reagenzugabe intensiv geschüttelt werden muß, da das Folin-Reagens nur im sauren pH-Bereich beständig ist, der Reaktionsansatz jedoch durch die Komponenten der Biuret-Reaktion stark basisch ist (pH = 10). Die Folin-Reaktion muß demnach durch sofortiges Umschütteln einer Probe einsetzen können, noch bevor das Folin-Reagens im alkalischen pH-Bereich zersetzt wird. Beachtet man diese Zusammenhänge nicht, erhält man fehlerhafte Ergebnisse.

Anmerkung:

Da Enzymaktivitätsbestimmungen generell sehr viel empfindlicher sind als die Proteinbestimmungsmethode, werden zur Enzymaktivitätsbestimmung 100-fach verdünnte α -Amylase-Proben im Vergleich zur Proteinbestimmung ausgeteilt (s. Auswertung!).

B) Material und Geräte

B1) Proteinbestimmung

(Reagenzien und Probe blau beschriftet)

- a) α -Amylase-Präparat in Phosphat-Citrat-Puffer (0.1M; pH 6.9) in gestufter Konzentration (Ansatz-Konzentration: 1/1);

(Die am Arbeitsplatz vorgefundene Konzentrationsstufe sofort im Protokollheft vermerken, sonst kann keine Bewertung der Ergebnisse erfolgen!)

- b) Cu-Tartrat-Reagens;
- c) Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagens;
- d) 4 normale, ca. 20 ml fassende Reagensgläser;
- e) Thermostat, 30°C;
- f) Digital-Fotometer, Wellenlänge 578 nm.

B2) Enzymaktivitäts-Bestimmung

(Reagenzien und Probe rot beschriftet)

- a) α -Amylase-Präparat in Phosphat-Citrat-Puffer (0.1M; pH 6.9) in gestufter Konzentration (Ansatz-Konzentration 1/100!!);
(Die am Arbeitsplatz vorgefundene Konzentrationsstufe sofort im Protokollheft vermerken, sonst kann keine Bewertung der Ergebnisse erfolgen!)
- b) Stärke-Lösung in Phosphat-Citrat-Puffer;
- c) Dinitrosalicylsäure;
- d) 4 große, ca. 30 ml fassende Reagensgläser;
- e) Thermostat, 30°C und 100°C;
- f) Digital-Fotometer, Wellenlänge 546 nm.

C1) Durchführung der Protein-Bestimmung:

Der Versuch wird mit 3 Parallelen und einem Blindwert für die kolorimetrische Analyse durchgeführt. Dabei werden der Blindwert-Lösung alle Reagentien außer der zu bestimmenden Substanz zugesetzt, d.h. anstelle der Enzym-Lösung wird Phosphat-Citrat-Puffer verwendet.

- a) **Ganz wichtig: Haben Sie die Proben-Konzentrationsstufe im Protokollheft vermerkt??!** (s.o.)
- b) Zu 1 ml α -Amylase-Lösung (3 Reagensgläser mit Probe, 1ml Puffer in Blindwert-Reagensglas) fügt man 5 ml Cu-Tartrat-Reagens (B1-b) zu, mischt und läßt den Ansatz für genau 10 Min. bei 30°C im Thermostaten reagieren.
- c) Nun fügt man, zu jedem Reagensglas einzeln, 0.5 ml Folin-Reagens (B1-c) hinzu, mischt jede Probe **sofort** intensiv durch (s.o.) und mißt nach 30 Minuten im Fotometer bei einer Wellenlänge von 578 nm gegen den Blindwert.

- d) Die Extinktionen der drei Proben können in die vorbereitete Tabelle (s. D, Auswertung) eingetragen und nach der dort besprochenen Methode ausgewertet werden.

C2) Enzymaktivitätsbestimmung

- a) **Ganz wichtig: Haben Sie die am Arbeitsplatz vorgefundene Proben-Konzentrationsstufe im Protokollheft vermerkt?!! (s.o.)**
- b) In große Reagensgläser (3 Proben, 1 Blindwert) 1 ml Stärke-Lösung pipettieren.
- c) Während man in das Blindwert-Reagenzglas 1 ml Puffer pipettiert, werden die 3 Proben-Reagensgläser mit je 1 ml α -Amylase-Lösung versetzt.
- d) Alle 4 Gläser sofort in ein Wasserbad bei 30°C stellen und kontrollieren, ob für das Abstoppen der Enzym-Reaktion ein Wasserbad zum Kochen gebracht worden ist.
- e) Genau 10 Min. die Enzym-Ansätze bei 30°C inkubieren und danach sofort 2 ml Dinitrosalicylsäure zugeben, die Proben 5 Minuten zur Denaturierung des Enzyms und zur Farbreaktion auf gebildete Maltose in kochendes Wasser stellen, die Gläser unter Leitungswasser abkühlen, mit 25 ml A. dest. auffüllen und gut mischen.
- f) Die Extinktionen der Proben gegen den Blindwert bei 546 nm messen, in die vorbereitete Tabelle eintragen und die Enzymaktivität der α -Amylase auswerten (s. D, Auswertung).

D) Auswertung

D1) Auswertung der Protein-Bestimmung

- a) Die Proteinkonzentration wird nach bereits bestehenden Eichkurven berechnet. Dabei entsprechen **100 μ g/ml Protein** einer **Extinktion von 0.155**. Über einen Dreisatz kann aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen die zugehörige Proteinkonzentration errechnet werden:

$0.155 : 100 \mu\text{g/ml} = \text{Mittelwert Extinktion} : X;$
--

$$X = \frac{100 \cdot \text{Mittelwert Extinktion}}{0.155} \text{ [}\mu\text{g/ml]};$$

Da der Faktor **100 / 0.155** aus der Eichkurve bei dieser Berechnung immer gleich bleibt, faßt man ihn als sogenannten „**Eichfaktor (EF)**“ (=Konzentration pro mittlere Extinktion) zusammen und schreibt die Bestimmungsgleichung:

$$\underline{\mu\text{g/ml Protein} = \text{EF} \cdot \text{Mittelwert Extinktion};}$$

$$\underline{\mu\text{g/ml Protein} = (100:0.155) \cdot \text{Mittelwert der Extinktionen.}}$$

b) Nach dieser Gleichung kann die Auswertung der Proben vorgenommen werden:

Konzentrationsstufe der Probe:	1	2	3	4
(bitte ankreuzen)				

Extinktionen:

.....

Extinktions-Mittelwert:

Die Protein-Konzentration der α -Amylase-Probe beträgt somit:

..... (µg/ml Probe)

D2) Auswertung der Enzymaktivitäts-Bestimmung

a) Aus bereits bestehenden Eichkurven für Maltose als Produkt der Enzymreaktion für α -Amylase ergibt sich ein Eichfaktor von:

$$\text{EF (Maltose)} = \frac{100 \mu\text{Mol/ml}}{0.585};$$

Für die Bestimmung der Enzymaktivität ergibt sich somit folgende Bestimmungsgleichung (s. A, Prinzip):

<p><u>Enzymaktivität (pro ml) =</u> = EF (Maltose) · Mittelwert Ext. pro Minute;</p>
<p><u>Enzymaktivität [U/ml]</u> = $\frac{\text{EF (Maltose)} \cdot \text{Mittelwert Extinktion}}{\text{Inkubationszeit (Minuten)}};$</p>
<p><u>Enzymaktivität [U/ml]</u> = $\frac{\text{EF (Maltose)} \cdot \text{Mittelwert Extinktion}}{10 \text{ (Minuten)}};$</p>

b) Nach dieser Gleichung kann die Auswertung der Enzymaktivitäts-Proben vorgenommen werden:

Konzentrations-Stufe der Probe:	1	2	3	4
(bitte ankreuzen)				
<u>Extinktionen:</u>				
.....
<u>Extinktions-Mittelwert:</u>			

Die Enzymaktivität des Präparates der α -Amylase beträgt somit:

..... (U/ml Probe) = katal (s. S. 18)

D3) Ermittlung der spezifischen Enzymaktivität:

a) Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Enzymkonzentration für die Enzymaktivitäts-Bestimmung 100-fach verdünnt im Vergleich zur Enzymprotein-Bestimmung angesetzt war (s.o.). Nach der Ausführung unter Punkt A) ergibt sich somit folgende Bestimmungsgleichung:

$$\text{spezifische Enzymaktivität} = \frac{\text{Enzymaktivität} \cdot 100}{\text{Enzymprotein-Gehalt}} ;$$

$$\text{spezifische Enzymaktivität} = \frac{\text{U/ml} \cdot 100}{\mu\text{g/ml}} .$$

b) Aus der Bestimmung von Enzymaktivität und Proteingehalt ergibt sich somit

eine spezifische Enzymaktivität von: = katal (s. S. 18)

Einführung in die Gaschromatografie (GC)
zu den Versuchen 3 und 13:

Versuch 3: Einführung in die Gaschromatografie: Qualitative Untersuchung zum Retentionsverhalten von Substanzen am Beispiel der homologen Reihe: Methanol, Äthanol, n-Propanol.

Versuch 13: Quantitative Alkohol-Bestimmung in verschiedenen alkoholischen Getränken mittels Gaschromatografie.

A) Prinzip der Gaschromatografie

Wie bereits einführend beschrieben, liegt allen chromatografischen Verfahren das folgende zentrale Prinzip zugrunde: Während der Chromatografie erfolgt eine kontinuierliche Verteilung eines Substanzgemisches innerhalb eines Zwei-Phasen-Systems, welches aus einer unbeweglichen (stationären) Phase und einer beweglichen (mobilen) Phase besteht.

Bei der Gaschromatografie ist die mobile Phase das mit definierter Flußrate durch die Säule strömende „Träger“-Gas (hier Helium), während die stationäre Phase entweder aus geeigneten Feststoffen mit großer sorbierender Oberfläche (GSC = gas-solid-chromatography) bestehen kann oder aus hochsiedenden Flüssigkeiten, die an nicht-sorptionsfähigen Feststoffen gebunden sind (GLC = gas-liquid-chromatography). Im überwiegenden Umfang wird heute die GLC angewendet.

Der stoffspezifische Verteilungskoeffizient α (s. auch S. 1)

$$\alpha = \frac{\text{Konz. (stationäre Phase)}}{\text{Konz. (mobile Phase)}}$$

entscheidet darüber, wie schnell eine Substanz die GC-Säule wieder verläßt. Eine Substanz mit sehr kleinem α -Wert (= hohe Konzentration in mobiler Gas-Phase bei kleiner Konzentration in stationärer Phase) verläßt die GC-Säule sehr rasch, während eine Substanz mit hohem α -Wert (= hohe Konzentration in stationärer Phase bei kleiner Konzentration in Gas-Phase) in der GC-Säule stark retardiert wird. Daraus resultiert bei einem vorgegebenen Substanzgemisch die Trennung einzelner Substanzen, wobei es allerdings einer längeren Methodenentwicklung bedarf, die Konditionen der mobilen und stationären Phase an das Trennproblem anzupassen. Einige Firmen haben sich darauf spezialisiert, sehr viele unterschiedliche GC-Säulen-Füllmaterialien für alle möglichen Anwendungsfälle zu entwickeln.

Ein Maß für die Zeitdauer des Verbleibs einer Substanz in der GC-Säule ist deren "Retentionszeit", die bei einer definierten stationären Phase temperatur- und stoffspezifisch ist. Über die in Vorchromatogrammen anhand von Reinsubstanzen bestimmten Retentionszeiten sind unbekannte Probenkomponenten relativ einfach identifizierbar.

B) Apparative Voraussetzungen der Gaschromatografie

(s. Abb. 3.1 und 3.2)

Ein Substanzgemisch wird über den "Einspritzblock" (Abb. 3.1, E) mittels kleinvolumiger gasdichter Spritzen auf die GC-Säule aufgebracht. Die Temperatur des Einspritzblocks muß in der Regel 30-50°C über der Temperatur der GC-Säule liegen, damit nicht niedrig-siedende Probenanteile vor dem Eindringen in die Säule ausgekühlt werden und damit der Analyse nicht zugänglich sind.

Am Ausgang der GC-Säule befindet sich der "Detektor" (Abb. 3.1, H), mit dem das Austreten getrennter Substanzen aus der GC-Säule nachgewiesen wird. Es gibt eine Reihe von Detektortypen mit unterschiedlich guter Eignung für bestimmte Substanzklassen. Der einfachste Detektor ist der auch bei uns eingesetzte "Wärmeleitfähigkeits"-Detektor (=WLD, s. Abb. 3.2).

Der WLD setzt allerdings eine exakt und konstant arbeitende Temperatur-Regelung von Vergleichszelle (VZ) und Meßzelle (MZ) voraus und basiert darauf, daß sich der elektrische Widerstand eines Hitzdrahtes aus Wolfram-Rhenium-Legierung dann verändert, wenn im Trägergasstrom eine Substanz aus der GC-Säule mitgeführt wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Wärme des Hitzdrahtes der Meßzelle durch Substanzen in unterschiedlichem Maße abgeleitet wird als vom Hitzdraht der Vergleichszelle, durch die Trägergas strömt.

Die Hitzdrähte von Meß- und Vergleichszelle sind in einer WHEATSTONE'schen Brückenschaltung (WB) mit verstellbaren Vergleichswiderständen verschaltet, die von einer konstanten Spannung gespeist wird. Fließt nur Trägergas aus der GC-Säule, wird die Diagonalspannung der Brücke (s. Abb. 3.2, Punkte 1 u. 2) mit einstellbaren Vergleichswiderständen auf "0" abgeglichen. Tritt danach eine Substanz aus der GC-Säule, so ergibt sich eine Spannungsänderung an der WB, deren Amplitude über einen Verstärker verändert werden kann. Die im Verlauf der Gaschromatografie sich kontinuierlich ändernden Spannungsamplituden werden mittels Schreiber oder Analog-Digital-Wandler (=ADC) durch einen Computer in Abhängigkeit von der Zeit registriert.

Die Spannungsänderung an der WB ist dabei direkt proportional der Konzentration an getrennter Substanz. Allerdings ist dabei zu beachten, daß jede Substanz bei definierter Konzentration eine unterschiedlich hohe Spannungsänderung am WLD auslöst, so daß für quantitative Auswertungen die substanzspezifischen Proportionalitätsfaktoren anhand von Standards zu bestimmen sind.

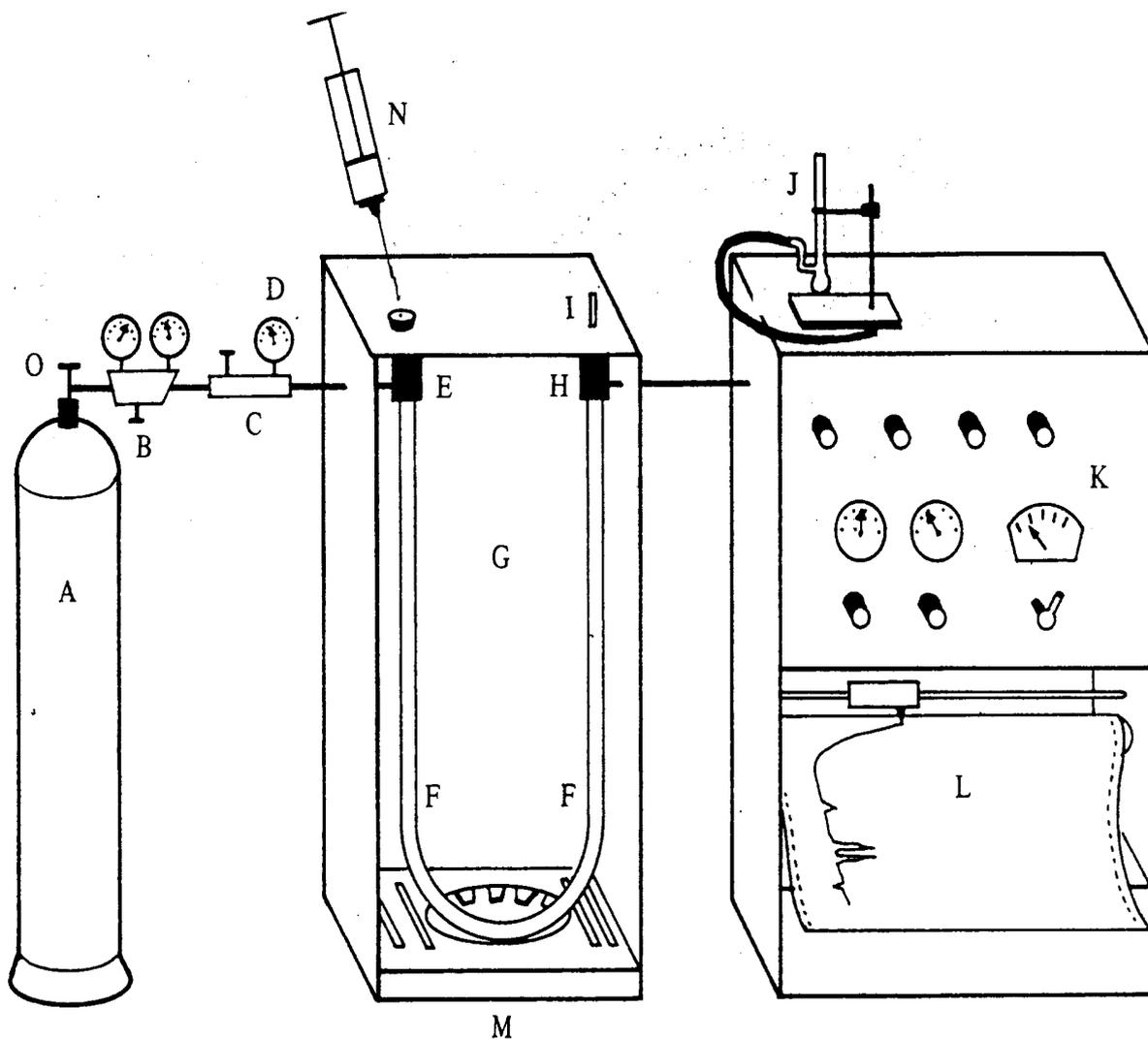
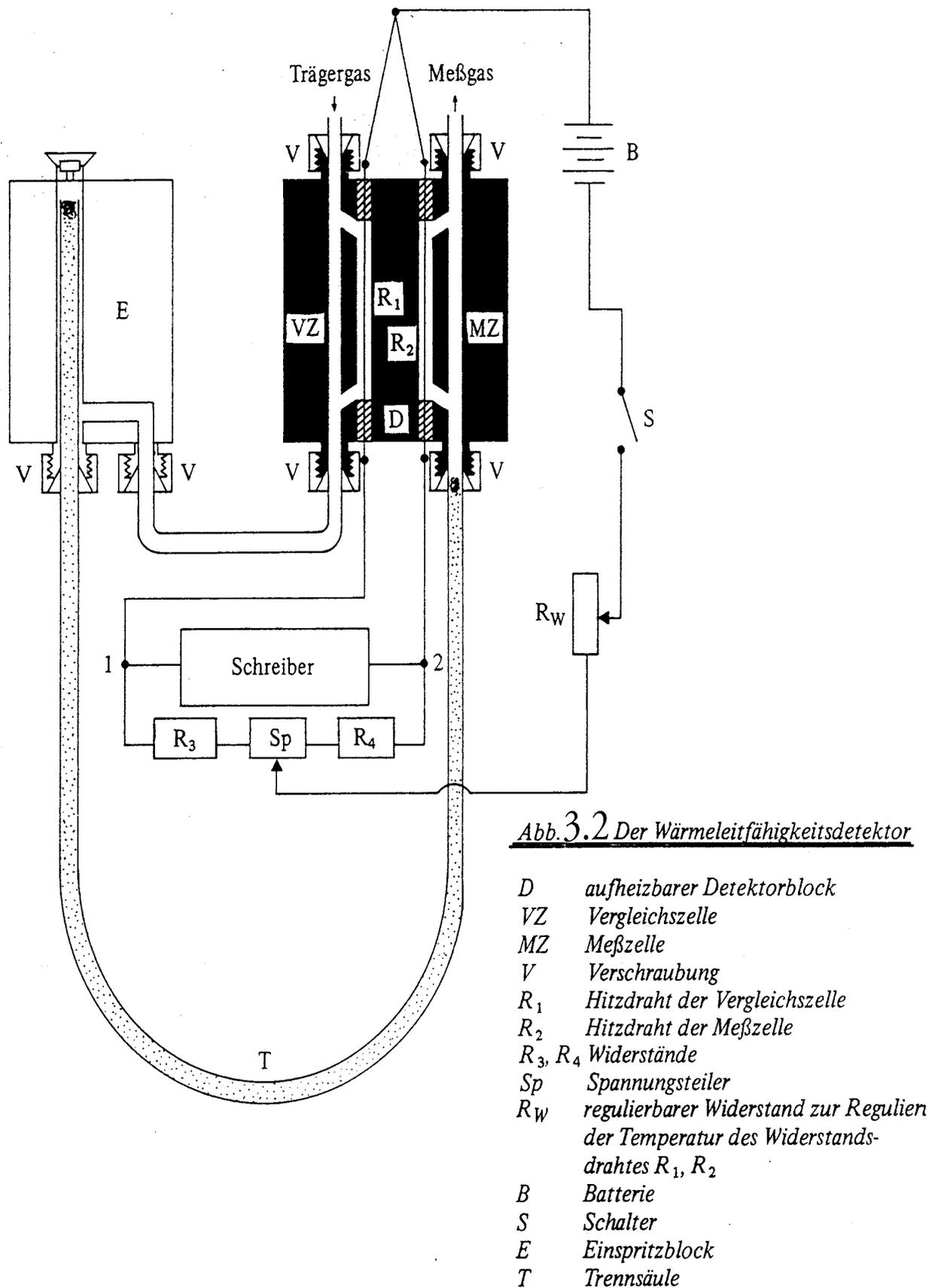


Abb. 3.1 Aufbauschema eines Gaschromatographen

- A Stahlflasche mit Trägergas
- B Druckreduzierventil
- C Nadelventil zur Feinregulierung der Gasströmung
- D Manometer, das den Gasdruck am Säuleneingang anzeigt
- E Einspritzblock
- F Trennsäule
- G Thermostat (Säulenofen)
- H Detektor
- I Detektorausgang
- J Strömungsmesser
- K Teil mit elektrischen Bauelementen
- L Schreiber
- M Gehäuse, in dem sich das Heizelement des Thermostats mit Tangentialgebläse zur Luftumwälzung befindet
- N Spritze zur Probeneingabe
- O Flaschenventil

Aus:

Wohlrab, A. (1982)



Beim WLD besteht zwischen dem Detektorsignal (S_c) und der Stoffkonzentration (c) der Zusammenhang $S_c = E_c \cdot c$, wobei E_c ein Detektor- und Substanz-spezifischer Proportionalitätsfaktor ist.

Die Empfindlichkeit (E_c) des WLD für eine bestimmte Substanz ist:

$$E_c = \frac{S_c}{c} \left(\frac{\text{mVolt}}{\text{mg/ml Trägergas}} \right).$$

Beim WLD sind Nachweisgrenzen in der Größenordnung von 10^{-8} bis 10^{-9} g Substanz pro ml Trägergas zu erreichen.

Auch die Temperatur des WLD muß wie beim Einspritzblock um ca. $30-50^\circ\text{C}$ höher sein als die der GC-Säule, wobei die Säulentemperatur in einem temperierbaren Säulenofen (s. Abb. 3.1, G), je nach der Verdampfbarkeit der Probensubstanzen, einzustellen ist. Dabei kann es bei schwierigen Trennproblemen auch durchaus notwendig sein, die Säulentemperatur im Verlauf eines Chromatogramms in zeitlich definierten Schritten auf höhere Temperaturen hochzufahren (Temperaturprogramm). Für unsere Trennaufgabe arbeiten wir jedoch "isotherm", d.h. die Säulentemperatur verbleibt im Verlauf der Gaschromatografie konstant.

Die Zuführung des Trägergases (s. Abb. 3.1, A-D) erfolgt aus einer Druckflasche mit Druckminderventil über ein Nadelventil zur Feinjustierung. Dabei muß gewährleistet sein, daß der Trägergasstrom konstant und mit definierter Durchflußrate zur Verfügung steht. Der Trägergasdurchfluß wird mittels Strömungsmesser (s. Abb. 3.1, J) auf den gewünschten Wert eingestellt. Wichtig dabei ist, daß alle gasführenden Teile des Gaschromatografen, also Einspritzblock, Säule und Detektor, gasdicht verbunden sind, ansonsten wären unreproduzierbare Ergebnisse zu erwarten. Alle Verschraubungen des Gassystems sind daher auf Dichtheit zu überprüfen (Seifenblasentest).

F) Einführende Literatur

KAISER, R. (1973): Chromatographie in der Gasphase (5 Bände).
B.I. Hochschultaschenbücher, Mannheim

WOHLRAB, A. (1982): Gaschromatographie.
Diesterweg, Salle, Sauerländer

1. Arbeitstag

Qualitative Untersuchung zum Retentionsverhalten von Substanzen in der Gaschromatografie am Beispiel der homologen Reihe (Methanol, Äthanol und n-Propanol).

Versuchsziel: Einführung in die Gaschromatografie.

A) Prinzip (s. Einführung, s.S. 25ff)

A1) Vorbemerkungen

Der vorhandene Gaschromatograf hat zwei Chromatographiesäulen eingebaut. Während die rechte Säule zur Trennung unpolarer Substanzen verwendet werden kann (OV 101 als Trennflüssigkeit auf Chromosorb als Trägermaterial), verfügt die linke Säule nur über das sorptionsfähige Trägermaterial Chromosorb 102 (ohne Beladung mit einer Trennflüssigkeit!). Diese GC-Säule ist zur Trennung polarer Substanzen geeignet. Über die Eigenschaften von Chromosorb 102 informiert folgende Tabelle (aus: R. KAISER, Chromatographie in der Gasphase, Teil III).

Wie in der Einführung beschrieben, sollte die Retentionszeit einer Substanz bei definierten gaschromatografischen Bedingungen konstant sein und zur Identifizierung einer Substanz dienen. Dabei ist die Retentionszeit einer Substanz von deren **Verteilungskoeffizienten α** (s.o., S. 1) in einem Zwei-Phasen-System, in unserem Falle sorptionsfähiges Trägermaterial und Trägergas, abhängig.

Zur Untersuchung von Faktoren, welche die Retentionszeit einer Verbindung an dieser speziellen GC-Säule beeinflussen und somit den Substanz-Verteilungskoeffizienten, verwenden wir in diesem Versuch die folgenden Alkohole, deren Strukturformeln sich um jeweils eine $-CH_2$ -Gruppe voneinander unterscheiden (s.S. 32):

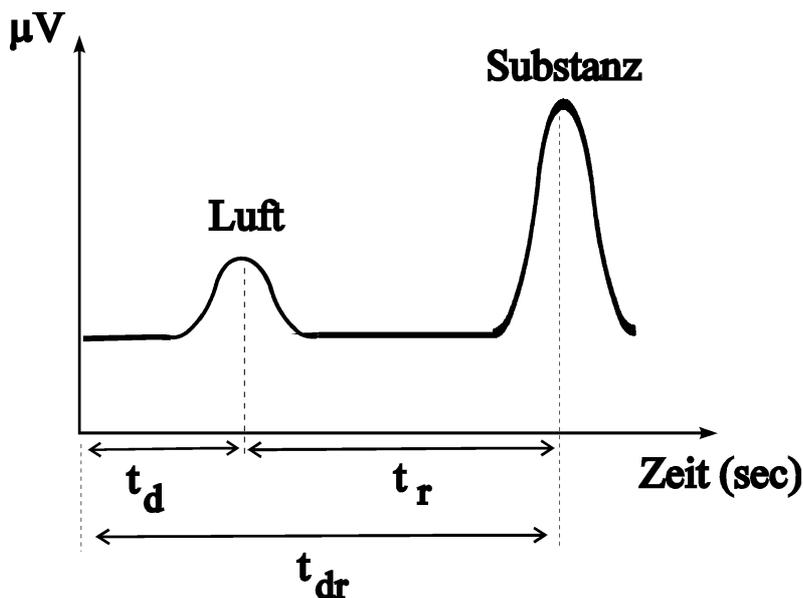
Wie diese Tabelle zeigt, steigt der Siedepunkt mit zunehmender Kettenlänge dieser Alkohole. Daraus ist abzuleiten, daß die Gaschromatografie bei einer Temperatur durchgeführt werden muß, bei der alle zu trennenden Substanzen flüchtig sind; wir wählen 125°C .

Methanol	Äthanol	n-Propanol	n-Butanol
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C-OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C-OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C-OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C-OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Siedepunkt (in °C) 64.5	78.3	97.0	118.0

Bei 125°C sind zwar alle Alkohole verdampft, aber Methanol, Äthanol und n-Propanol haben bei dieser Temperatur einen höheren Dampfdruck im Trägergas der GC-Säule als n-Butanol, so daß die kürzer-kettigen Alkohole schneller die Säule verlassen können als n-Butanol. Hinzu kommt, daß die vier Alkohole mit zunehmender Kettenlänge unpolarer werden, da sich die unpolare Restgruppe der Moleküle vom Methan zum n-Butanol zunehmend vergrößert. Auch dieser Effekt führt schließlich dazu, daß n-Butanol in Relation zu den kürzer-kettigen Alkoholen in unserer zur Trennung polarer Substanzen geeigneten GC-Säule (Chromosorb 102, s. Tabelle 3.1) stärker retardiert wird. Die Reihenfolge der Elution von der GC-Säule ist daher Methanol, Äthanol, n-Propanol und n-Butanol.

Tabelle 3.1: Eigenschaften von Chromosorb 102 (nach KAISER, 1973)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Vorbehandlung	Oberfläche m ² /g	Dichte (g/ml)
Chromosorb 102	poröses Styrol-Divinylbenzol-Polymeres aus Röhm u. Haas Amberlite NAD-2	warme Extraktion 24h mit Aceton und 24h mit n-Hexan. Ausheizen 24h bis 300°C	300-400	0.20



Zur genauen Bestimmung der Retentionszeiten benötigen wir noch das "Totvolumen" der GC-Säule, d.h. das Volumen an Trägergas, welches sich nach Einspritzen der Probe zunächst noch in der Säule befindet. Nach dem Einspritzen der Probe vergeht also noch eine bestimmte Zeit, bis das Träger-gas mit Probenkomponenten am Säulenausgang (Detektor) ankommt. Diese Zeit ist

meßbar, wenn mit der Probe Luft in die Säule eingespritzt wird. Luft bewegt sich gleich schnell wie Trägergas durch die Säule und ist am Chromatogramm als kleiner Peak nach dem Einspritzen der Probe kenntlich.

Die Zeit zwischen Einspritzen der Probe und dem Luftpeak wird als Durchbruchzeit (t_d) bezeichnet (s. Skizze) und kennzeichnet das Volumen an Trägergas in der Säule. Die Gesamt-Retentionszeit einer Substanz (t_{dr}), vermindert um t_d , führt zu der wahren Retentionszeit t_r .

Trägt man die ermittelten Retentionszeiten für die 4 Alkohole auf der logarithmisch geteilten Y-Achse in Abhängigkeit von der Anzahl an Kohlenstoff-Atomen auf der X-Achse auf, ergibt sich eine lineare Abhängigkeit beider Größen. Diese Darstellung ist auch hilfreich, wenn man die Retentionszeit länger-kettiger Alkohole abschätzen wollte. Aus dem Beispieldiagramm (s. S. 36) ergibt sich z.B. für n-Pentanol eine Retentionszeit von ca. 78 Minuten.

B) Material

1.) Gaschromatograf mit WLD und Ankopplung an einen Computer über eine Analog-Digital-Wandler-Steckkarte;

<u>Trennbedingungen:</u>	
Säule:	Chromosorb 102, polar
Säulen-Temperatur:	125°C
WLD-Temperatur:	160°C

Einspritzblock-Temperatur:	160°C
Trägergas:	Helium
Trägergas-Flußrate:	60 ml/Minute

2.) Mikroliter-Spritze

3.) Probe: je 5ml Methanol, Äthanol und n-Propanol

C) Durchführung

- a) Zunächst abwarten, bis der Gaschromatograf auf eine Säulen-Temperatur von 125°C eingestellt ist. Im Hauptmenü des Computerprogramms "Chromatogramm aufnehmen" anwählen und eine gerade Basislinie bei Verstärkung x8 und 50 mA Brückenstrom abwarten.
- b) Mittels 5µl-Spritze 2,5µl des Probengemisches aufziehen und das Restvolumen des Kolbens mit Luft füllen. Spritze waagrecht halten, die Nadel mit der Hand unterstützen und sie vorsichtig durch das Septum des Einspritzblocks durchstechen und einschieben. Danach den Kolben zügig entleeren, die Starttaste S auf der Computertastatur drücken und die Spritze langsam aus dem Einspritzblock ziehen.
- c) Das Signal am Bildschirm solange verfolgen, bis der n-Propanol-Peak aus der Säule ausgetreten ist und das Chromatogramm-Aufnahme-Programm durch <ESC> verlassen. Auf dem Bildschirm erscheint nun das gesamte Chromatogramm. Durch Drücken der Optionstaste <O> (oder RETURN) gelangt man in ein Untermenü und wählt "Hardcopy" zum Ausdruck des Chromatogramms.

D) Auswertung

Die Erfassung der Retentionszeiten der 3 Alkohole und des Luftpeaks erfolgt aus dem Chromatogramm am Bildschirm, indem mit dem Grafik-Cursor die Peakspitzen der Substanzen aufgesucht werden. Bei jeder Position des Cursors wird nämlich am unteren Bildschirmrand die aktuelle Signalamplitude und Retentionszeit angegeben, so daß man leicht die jeweiligen Peakmaxima mit der zugehörigen Retentionszeit auffinden kann.

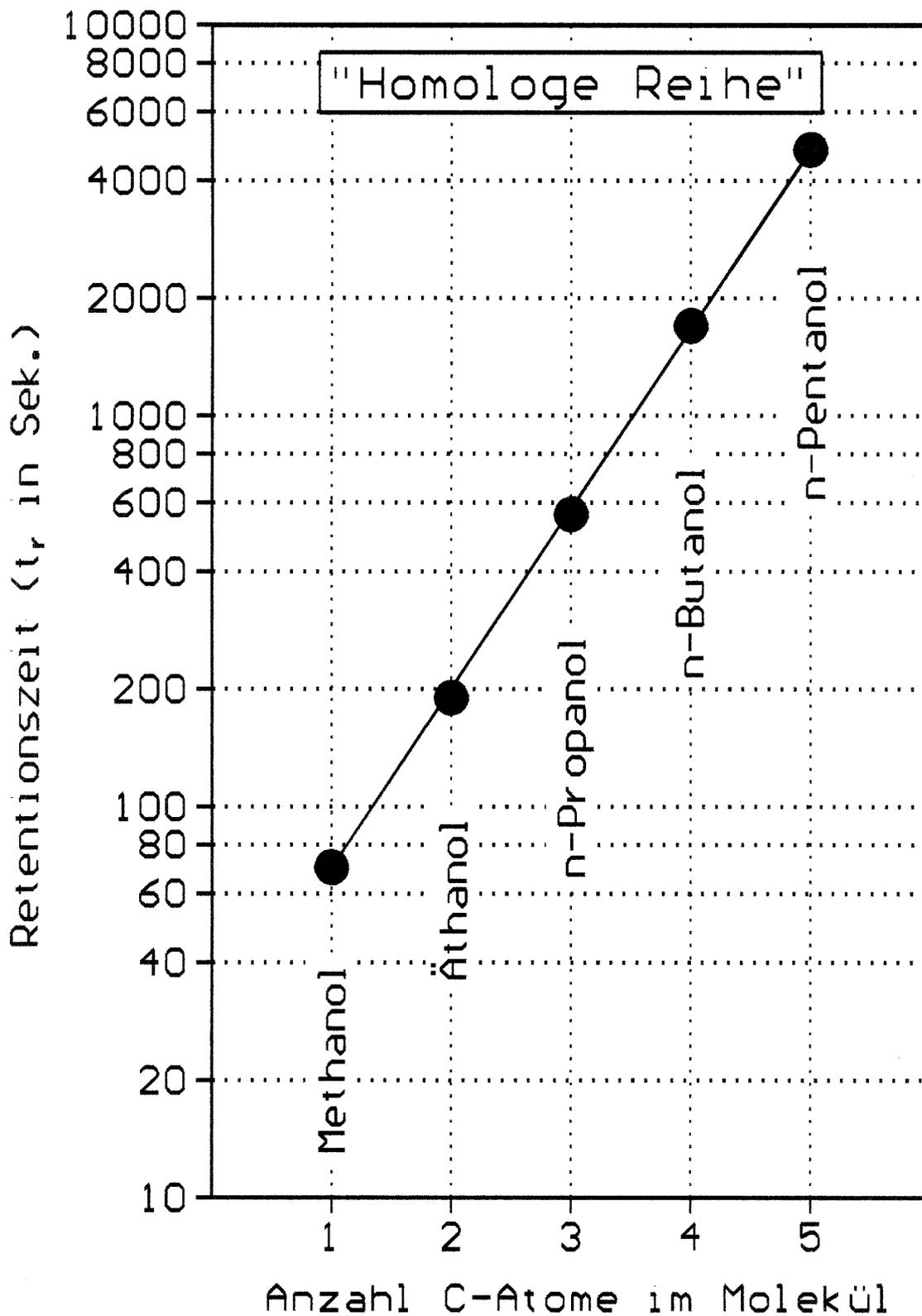
Die Retentionszeiten der 3 Alkohole reduziert man um die Retentionszeit des Luftpeaks (s. folgende Auswertungstabelle) und trägt die bereinigten Retentionszeiten (t_r) auf der logarithmisch geteilten Y-Achse gegen die Anzahl C-Atome in den Alkohol-Molekülen auf halblogarithmisches Papier auf (s. anliegendes Beispiel).

Luft - t_d (Sec)=			
		t_{dr} (Sec)	t_r (Sec)
Methanol	
Äthanol	
n-Propanol	
n-Butanol		?? (extrapolieren)

E) Literatur

KAISER, R. (1973): Chromatografie in der Gasphase (5 Bände).
B.I. Hochschultaschenbücher, Mannheim

Beispiel zur Auswertung der Retentionszeiten von 5 Alkoholen



2. Arbeitstag

Qualitative Untersuchung eines Gemisches aus Cholinchlorid (CC) und Chlorcholinchlorid (CCC) mittels Dünnschichtchromatografie.

Versuchsziel: Demonstration der Leistungsfähigkeit der DC bei der Trennung eng verwandter Moleküle bei eindimensionaler Arbeitsweise und gleichzeitig Vorbereitung auf die zweidimensionale Papierchromatografie (**Versuch 5**).

A) Prinzip (s. auch Einleitung zu chromatografischen Verfahren)

Dazu noch ein Hinweis: Bei eindimensionaler Arbeitsweise unterteilt man das Dünnschichtchromatogramm in einzelne Bahnen. Außer den zu untersuchenden Proben können auf diese Weise auch Referenzsubstanzen zur Identifizierung unbekannter Probenkomponenten mitlaufen. Dabei werden die getrennten Substanzen nach dem sogenannten R_f -Wert charakterisiert und unterschieden. Dieser Wert ist ein Maß für die Substanz-spezifische Wanderungsgeschwindigkeit im Chromatografieverlauf und sichtbarer Ausdruck des Verteilungskoeffizienten α . Der R_f -Wert* wird errechnet, indem man die Laufstrecke einer Substanz **A** (Auftragspunkt bis Substanzschwerpunkt) in Relation zur Wanderungsstrecke des Laufmittels **B** (Auftragspunkt bis Laufmittelfront) setzt: $R_f = A / B$.



In diesem Versuch ist Cholinchlorid (CC) von Chlorcholinchlorid (CCC) zu trennen. CCC ist als Halmverkürzungsmittel zur Verhinderung des Lagerns von intensiv mit Stickstoff gedüngtem Getreide bekannt geworden.

Die Trennung während der Dünnschichtchromatografie kommt zustande, weil durch Einführung der Cl-Gruppe in CC eine Verminderung der Polarität des CCC Moleküls gegenüber Cholinchlorid eintritt. Während die polarere Substanz Cholinchlorid eher in der stationären Phase (Wasseranteil des Laufmittels im Silikagel!) vorzufinden ist, bevorzugt CCC eher die mobile Phase (Äthanol/HCl). Wie bei der Papierchromatografie (**Versuch 5**) ist dabei zu beachten, daß das 'Laufmittel' beide Verteilungsphasen enthält, die erst im Verlaufe der Chromatografie am Sorbens (Silikagel bzw. Cellulose des Papiers) als solche wirksam werden.

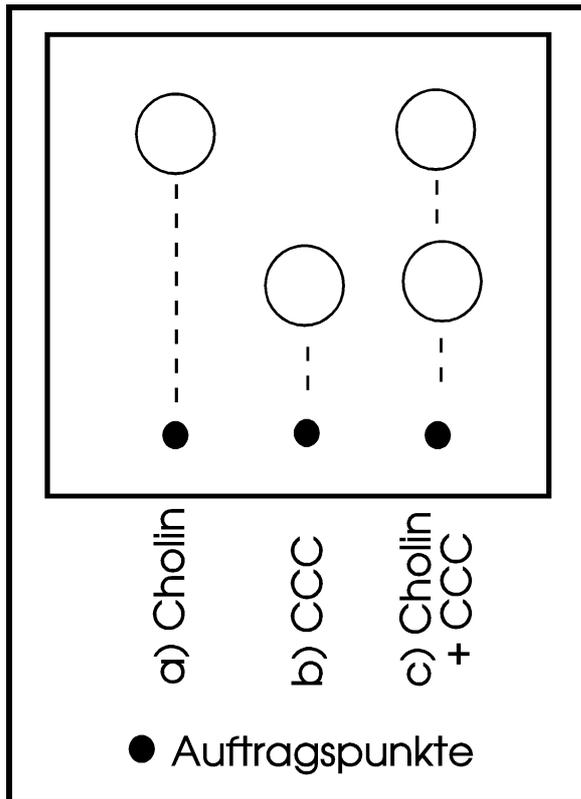
* R_f = Relative front

B) Material und Geräte

- a) Cholinchlorid/Chlorcholinchlorid-Lösung:
(pro ml Lösung 1mg CCC und 2mg Cholinchlorid);
- b) Glasplatten (20x20cm) mit Silikagel-Beschichtung;
- c) Dünnschichttank zur Aufnahme der Dünnschichtchromatogramme;
- d) Laufmittel (0.2N HCl mit 25% Äthanol);
- e) Hb-Pipette, 20 μ l, mit Schlauch und Mundstück oder 20 μ l Eppendorf-Pipette;
- f) Äthanol abs. zum Reinigen der Hb-Pipette;
- g) KMnO₄-Lösung und Filterpapier;
- h) Fön;
- i) Dragendorff'sches Reagens:
Zunächst sind zwei Stammlösungen herzustellen:
 - 1) 0.85g Wismutsubnitrat in einer Mischung aus 10ml Eisessig und 40ml A. dest.;
 - 2) 8.0g KJ in 20 ml A. dest.;Zum Gebrauch mischt man 1.0ml Lösung 1) und 1.3ml Lösung 2) in einem 25ml-Kölbchen mit 5.0 ml Eisessig und füllt mit A. dest. auf 25ml auf.
- j) Sprühvorrichtung im Abzug.

C) Durchführung (je 4 Studenten)

- a) Bereits vor Beginn des Praktikums ist das Laufmittel (B, d) in die Chromatografietanks zu füllen, damit die Sättigung der Tankatmosphäre bis zum Beginn dieses Versuches gewährleistet ist.
- b) Zunächst sollte der Umgang mit einer Hb-Pipette bzw. Eppendorf-Pipette zum Auftragen von Proben auf die Dünnschichtplatte geübt werden. Hierzu wird unter Verwendung von KMnO₄-Lösung (sie ist in der Hb-Pipette und auf dem Filterblatt gut sichtbar!) versucht, genau 20 μ l anzusaugen und portionsweise unter Trocknung mit einem Fön kleine Substanzflecken auf Filterpapier aufzutragen. Je besser es gelingt, Proben in kleinen Flecken aufzutragen, desto besser wird die Trennung der anschließenden Chromatografie.



c) Erst wenn die Handhabung der Pipette voll beherrscht wird, sind 20µl der Cholinchlorid/CCC-Probe (B, a) entsprechend dem nebenstehenden Schema auf die Dünnschichtplatte aufzutragen. Die Auftragspunkte sind auf einer gedachten Linie so hoch vom unteren Rand der Platte zu wählen, daß sie nicht in das Laufmittel eintauchen. Dabei ist weiterhin sorgfältig darauf zu achten, die Beschichtung der Platte beim Auftragsprozeß nicht zu beschädigen, da sonst der kapillare Aufstieg des Laufmittels im Sorptionsmaterial der Platte nicht funktionieren kann. Die Spitze der verwendeten Pipette sollte nur ganz vorsichtig auf die Platte gesetzt werden. Dabei kann man sich vielleicht am besten helfen, indem man ein Lineal zur Stütze der

auftragenden Hand über die Platte hält. Auch sollte jeder Hautkontakt mit der Plattenoberfläche vermieden werden. Weiterhin ist die Platte nur an ihren Rändern vorsichtig (Fingernägel?) zu halten und zu transportieren.

e) Die mit dem Fön gut getrockneten Dünnschichtchromatogramme schnell in den Chromatografietank stellen (2 DCs pro Tank) und diesen sofort wieder verschließen, damit die Kammersättigung nicht allzusehr gestört wird. Die Platte sollte bei Raumtemperatur in etwa 1.5–2 Stunden entwickelt sein, wobei das Laufmittel etwa im oberen Viertel angelangt sein sollte (aufsteigende Chromatografie).

e) Nach Ablauf der Chromatografie die Platten aus dem Tank nehmen und unter dem Abzug (Geruchsbelästigung!), gegebenenfalls unter Einsatz des Föns, trocknen. Bereits zu diesem Zeitpunkt wird die Laufmittelfront der noch feuchten Platte mit einem Bleistift nachgezogen, später nach Trocknung der Platte ist diese nicht mehr zu erkennen! (nach erfolgter Chromatografie kann nun die Silikagelschicht der Platte zerkratzt werden!).

f) Mit einer geeigneten Sprühvorrichtung wird nun das Dragendorff'sche Reagens gleichmäßig über die Platte gesprüht (**Vorsicht: HCl!**).

g) Nach Trocknung der Platte erscheinen die Flecken der beiden Substanzen angefärbt auf dem Chromatogramm. Mit einem Bleistift die beiden Flecken umfahren und die Stellen höchster Farbtintensität markieren (R_f -Wert-Ermittlung, s.S. 37).

D) Auswertung

Zur quantitativen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen (Papierchromatogrammen, Elektropherogrammen etc.) werden heute Computer-gesteuerte Bildauswertungsverfahren eingesetzt. Im Rahmen dieses Praktikums soll jedoch nur gezeigt werden, wie die Substanz-spezifische Wanderungsgeschwindigkeit anhand des R_f -Wertes zu charakterisieren ist. Gemäß seiner Definition (s.o.) ist der R_f -Wert die auf die Wanderungsstrecke des Laufmittels vom Auftragspunkt bezogene Wanderungsstrecke einer Substanz, wobei der R_f -Wert je nach Gleichmäßigkeit der Schichtdicke des Silikagels eine gewisse Varianz aufweisen kann:

Auftragspunkt	Substanz	Strecke A Auftragspunkt - Substanzmitte-	Strecke B Auftragspunkt - Laufmittelfront	R_f -Wert (A/B)
<u>a)</u>	Cholinchloridcmcm
<u>b)</u>	CCCcmcm
<u>c)</u>	Cholinchloridcmcm
	CCCcmcm

2. Arbeitstag

Zweidimensionale Papierchromatografie von Aminosäuren:

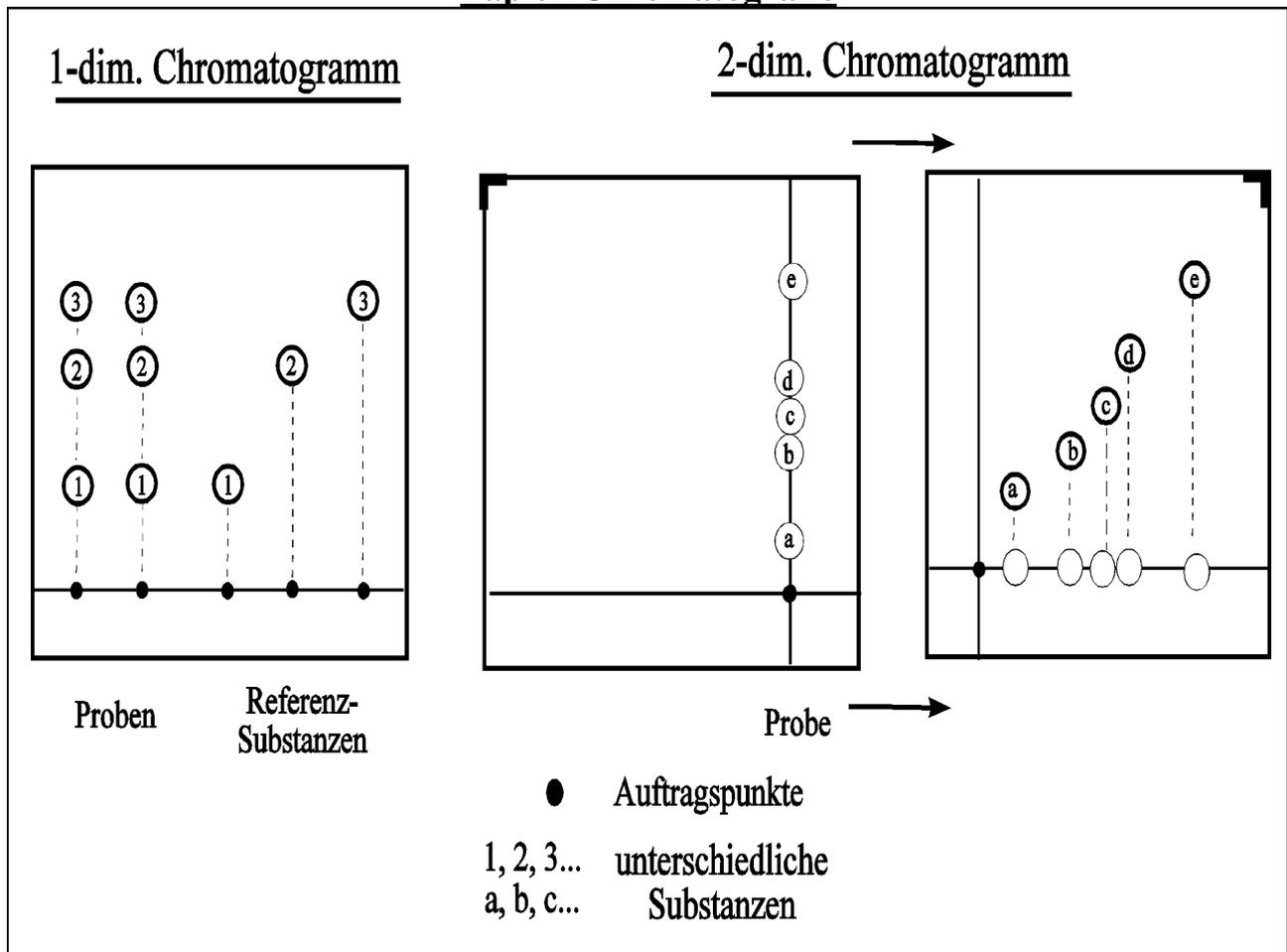
Auftragen eines Aliquots der Aminosäure-Fraktion (von Versuch 1) auf Chromatografiepapier.

Versuchsziel: Vorstellung zweidimensionaler Chromatografieverfahren und einfache Möglichkeiten zu deren quantitativer Auswertung.

A) Prinzip

(s.a. Einleitung zu chromatografischen Verfahren und Dünnschichtchromatografie, Versuch 4)

Erklärung der ein- und zwei-dimensionalen „aufsteigenden“ Dünnschicht- oder Papier-Chromatografie



Bei der zweidimensionalen Papierchromatografie wird im Gegensatz zu eindimensionalen Verfahren (s. z.B. **Versuch 4**) die Probe nur auf einer Stelle aufgetragen. Nach der Chromatografie im ersten Laufmittel wird das Chromatogramm getrocknet und, um 90° gedreht, in einem zweiten Laufmittelsystem chromatografiert. Der Vorteil dieses Verfahrens ist die bessere Trennung von

Substanzen, die bei eindimensionaler Arbeitsweise nur unzureichend getrennt werden könnten. Je nach Anwendungsfall sind die beiden Laufmittelsysteme nach bestem Trenneffekt zu optimieren.

B) Material und Geräte

- a) Aminosäure-Fraktion in 400ml Becherglas vom 1. Arbeitstag; sie wurde inzwischen bei 50°C im Trockenschrank zur Trockne eingengt.
- b) Hb-Pipette, 20µl, mit Schlauch und Mundstück oder Eppendorf-Pipette;
- c) Chromatografie-Papier, 20x20cm und Filterpapier zum Üben des Probenauftrags;
- d) Äthanol abs. zum Reinigen der Hb-Pipette;
- e) Gummiwischer;
- f) KMnO₄-Lösung und Filterpapier;
- g) Fön.
- h) Laufmittel:
 - 1. Laufrichtung: Wassergesättigtes Phenol: 150 g Phenol + 50 ml Wasser (60°C)
 - 2. Laufrichtung: Butanol/Eisessig/Wasser = 200/25/100 (ml)

C) Durchführung (je 4 Studenten)

- a) Jede 4er-Gruppe hat vom 1. Arbeitstag (Vorreinigung der Aminosäure-Fraktion mittels Kationen-Austauscher) zwei Proben zur Verfügung. Davon bitte eine Probe auswählen und **die vermerkte Proben-Konzentrationsstufe a, b, c oder d sofort in das Protokollheft schreiben!**
- b) Da die Handhabung der zu verwendenden Pipette vom Probenauftrag auf die Dünnschichtplatte bereits beherrscht wird, nun die in einem Becherglas eingetrocknete Aminosäureprobe mit genau 2ml A. dest. aufnehmen, die Aminosäuren an der Glasinnenseite mit Gummiwischer lösen und 20µl davon **portionsweise** (s.o.) unter Trocknung mit dem Fön auf das Chromatografiepapier am Auftragspunkt (Kreuzungspunkt der beiden eingezeichneten Linien) auftragen. Dabei wird das Papier am Auftragspunkt auf ein Uhrglas gelegt, damit die aufgetragene Probe an der Papierunterseite nicht abgesaugt wird (durch darunter liegendes Papier etc.!) und an anderer Stelle mit einem Uhrglas beschwert damit das Papier unter dem Fön nicht flattert.
- c) Das Chromatografiepapier sollte dabei nur an der Seite gegenüber des Auftragspunkts mit den Fingern berührt werden, damit nicht Aminosäuren der Hände

(Handschweiß!) als Verunreinigung der Probe in Erscheinung treten. Nach Möglichkeit verwendet man eine Pinzette zur Hantierung mit dem Papier.

- d) Das Chromatografiepapier mit dem Gruppennamen und der Konzentrationsstufe an den vorbereiteten Stellen kennzeichnen. Hierzu bitte nur einen Bleistift verwenden (Kugelschreiber oder Tinte nicht verwenden, da die Farbstoffe mit den Laufmitteln der Chromatografie ebenfalls wandern würden).
- e) Zur zweidimensionalen Chromatografie kommen in den vermerkten Laufrichtungen Phenol-Wasser- und Butanol-Eisessig-Wasser-Gemische zur Anwendung. Trotz relativ kurzer Laufzeiten (5 Stunden bei Phenol-Wasser und ca. 4 Stunden bei Butanol-Eisessig-Wasser) ist die eigentliche Chromatografie im Verlauf des Praktikumstages aus Zeitgründen nicht möglich, sie erfolgt wie die Durchführung der Dünnschicht-Chromatografie in Glastanks vom Betreuer (s. Versuch 4, s.S. 37).

C1) Wodurch kommt die Trennung der einzelnen Aminosäuren bei der Papierchromatografie zustande?

Amino-Säuren in der Probe	Asp	Gly	Ala	Val	Leu
Struktur	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{O}=\text{C}-\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{C}-\text{H} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{C}-\text{H} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$
R _f -Wert im Laufmittel Phenol/Wasser (AEBI, 1965)	0.13	0.40	0.59	0.79	0.83
Löslichkeit der Aminosäuren in Wasser (g/100ml) (AEBI, 1965)	0.50	25.0	16.7	8.85	2.19

Wie der obigen Tabelle zu entnehmen ist, deutet der R_f -Wert der homologen Reihe **Gly**, **Ala**, **Val** und **Leu** darauf hin, daß die Affinität zur stationären Phase (=Wasser als Bestandteil des Laufmittels, sorbiert durch die Cellulose des Papiers) einerseits mit zunehmender Kettenlänge am α -C-Atom immer schwächer wird, was auch in der Verringerung der Wasserlöslichkeit dieser Aminosäuren zum Ausdruck kommt. Andererseits weist **Asp** die geringere Wasserlöslichkeit der fünf Aminosäuren auf, doch **Asp** zeigt von allen fünf Aminosäuren den geringsten R_f -Wert. Allein nach seiner Wasserlöslichkeit müßte **Asp** den höchsten R_f -Wert aufweisen.

Dies macht deutlich, daß insbesondere Struktureffekte bei der Affinität der Aminosäuren zu einer der beiden Phasen im Zwei-Phasen-System eine wichtige Rolle spielen (s.a. **Alkohole in der Gaschromatografie**). Bei **Asp** ist es die zweite Carboxylgruppe, die eine größere Hydrophilität dieser Aminosäure bewirkt. Trotzdem weist **Asp** eine schlechtere Wasserlöslichkeit auf als z.B. **Val** mit mehreren apolaren Gruppen.

Die Bedeutung von Struktureffekten für die Affinität zur stationären oder mobilen Phase zeigt besonders die Aminosäure **Prolin (Pro)**. Sie weist mit 162 g/100ml Wasser die höchste Wasserlöslichkeit aller Aminosäuren auf, hat dagegen mit 0.88 einen der höchsten R_f -Werte aller Aminosäuren (s. AEBI, 1965), d.h. daß diese Aminosäure eine sehr hohe Affinität zur mobilen Phase (Phenol) und nicht zur stationären Phase (Wasser) aufweist. Bei Prolin ist es offenbar die heterozyklische Ringstruktur, die bei hoher Wasserlöslichkeit dieser Aminosäure gleichzeitig auch ihren lipophilen Charakter ausmacht.

Aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit hat **Pro** übrigens eine wichtige Funktion im Stoffwechsel von Pflanzen zur Osmoregulation bei Wasser- oder Salzstress.

D) Auswertung

Die quantitative Auswertung der Papierchromatografie erfolgt im **Versuch 7 am 4. Arbeitstag** (s.S. 77).

(2. Arbeitstag)

Sephadex-Gelfiltration zur Trennung nach Molekülgröße am Beispiel einer aus RNA und AMP bestehenden Reinsubstanz-Probe (einschließlich Erstellung von RNA- und AMP-Eichkurven).

Versuchsziel: Einführung in die Säulen-Chromatografie mit Schwerpunkt Molekularsieb-Gelfiltration.

A) Prinzip (s.a. Einleitung)

Die sogenannte "Gelfiltration" mit Sephadex (Typ G) ist ein chromatografisches Verfahren, das eine Sonderstellung unter allen übrigen Verfahren dadurch einnimmt, daß es die Trennung von Substanzen nach deren Molekulargewicht (Molekülgröße) ermöglicht.

Ähnlich wie bei der Kationen-Austauscher-Trennung in **Versuch 1** (1. AT) wird Sephadex vor allem zur Säulen-Chromatografie eingesetzt. Es besteht aus kleinen Partikeln einer hydrophilen unlöslichen Substanz, die durch Quervernetzung von Kettenmolekülen des Polysaccharids **Dextran** hergestellt wird. Diese Substanz besteht nach Suspendierung in Puffer aus einem drei-dimensionalen Netzwerk von Polysaccharidketten elektrochemisch neutralen Verhaltens, d.h. sie verhält sich indifferent gegenüber Kationen und Anionen (Typ G im Unterschied zu DEAE-Sephadex-Anionen-Austauschern und CM- und SE-Sephadex-Kationen-Austauschern).

Sephadex, Typ G, wird in verschiedenen Vernetzungsgraden hergestellt, die eine unterschiedlich große Porosität des Netzwerkes bedingen. Ein hoher Vernetzungsgrad ergibt eine kompakte Struktur mit geringer Porosität, während ein niedriger Vernetzungsgrad eine hochporöse Struktur zur Folge hat. Entsprechend dem Vernetzungsgrad erhält man verschiedene Untergruppen des Typs G (G-10, G-25, G-50, G-75, G-100 und G-200), wobei der Vernetzungsgrad in dieser Reihung von G-10 bis G-200 ab- und die Porosität zunimmt.

Da der Vernetzungsgrad von Sephadex wiederum die Größe der in das Netzwerk diffundierbaren Moleküle bestimmt, während die über eine bestimmte Größe hinausgehenden Moleküle ungehindert die Säule verlassen können, hängt die Wahl des zu verwendenden Sephadex-Typs von der Größe der zu trennenden Moleküle ab.

Angaben zu einigen Sephadex-G-Typen:

Sephadex-Typ	Korngröße (µm)	Wasser- Aufnahme (ml/g)	Trennbereich (MG)
G-25	20 - 80	2.5	1000 - 5000
G-50	20 - 80	5.0	10000 - 30000
G-100	40 - 120	10.0	40000 - 150000
G-200	40 - 120	20.0	- 800000

Sephadex-Typ	Gelbett- Volumen (ml/g)	äußeres Volumen (ml/g)	inneres Volumen (ml/g)
G-25	5	2	2.5
G-50	10	4	5.0
G-100	17	6	10.0
G-200	30	9	20.0

Wirkungsweise von Sephadex

Zur Herstellung einer Sephadex-Säule wird trockenes Sephadex in für die Trennaufgabe geeigneten Puffern gequollen (s. Wasseraufnahme von Sephadex, obige Tabelle) und vorsichtig in einer Glas- oder Plastik-Säule aufgeschichtet. Je nach dem Vernetzungsgrad der einzelnen Sephadex-Typen ergibt sich nach der Packung der Säule das sogenannte „innere Volumen“ (s.o.), das von dem Polydextran-Netzwerk gebildet wird, und das „äußere Volumen“ (s.o.) im Puffer rund um das Gelnetzwerk. Je nach dem Sephadex-Typ können nun relativ kleine Moleküle innerhalb oder unterhalb des Trennbereichs (s. obere Tabelle) in das innere Volumen der Sephadex-Matrix diffundieren, während sich größere Moleküle nur im äußeren Volumen aufhalten können. Wird die Sephadex-Säule mit Puffer kontinuierlich durchströmt (eluiert), werden die größeren Moleküle im äußeren Gelvolumen, im sogenannten Ausschlußbereich, aus der Säule eluiert, während die im Gelnetzwerk befindlichen kleineren Moleküle im Trennbereich der Sephadex-Säule, entsprechend ihrem Molekulargewicht verzögert, die Säule verlassen (=umgekehrter Siebeffekt!).

Hierzu ein Beispiel:

Substanz 1: MG = 2500 **Substanz 2:** MG = 10000
Trennbereich G-25: 1000-5000
Ausschlußbereich G-25 : >5000 (s. obige Tabelle)

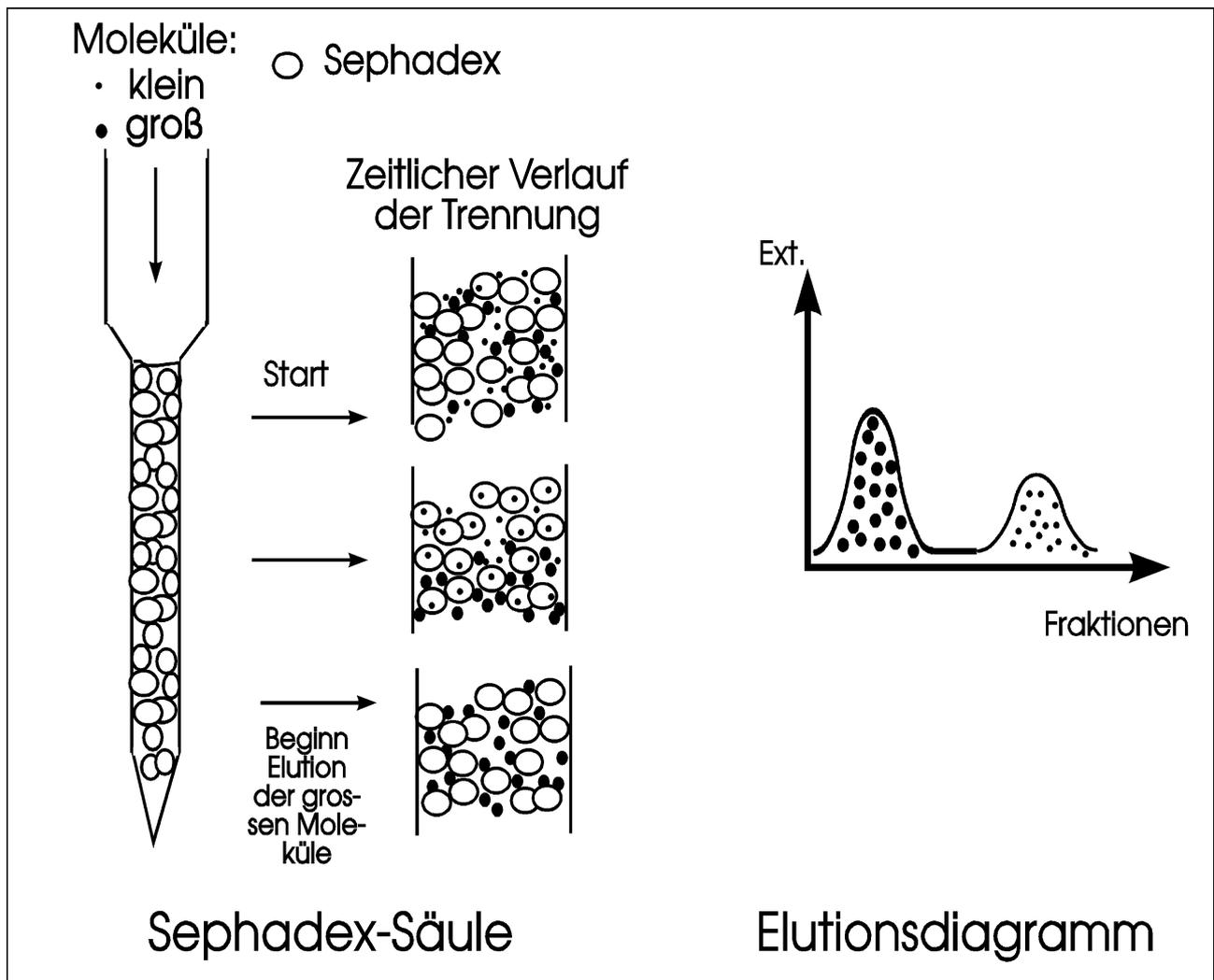
Substanz 1 kann in das Gelnetzwerk diffundieren und wird also entsprechend ihrer Größe (=Molekulargewicht) in der Elution verzögert.

(Mehrere Substanzen mit Molekulargewichten im Bereich von 1000-5000 würden voneinander getrennt, es ergäben sich mehrere "Peaks" in der Elutionskurve.)

Substanz 2 kann nicht in das Gelnetzwerk diffundieren und wird im äußeren Volumen der Gelsäule eluiert.

(Z.B. 10 Substanzen mit Molekulargewichten über 5000 würden gleichzeitig in einem "Peak" in der Elutionskurve eluiert.)

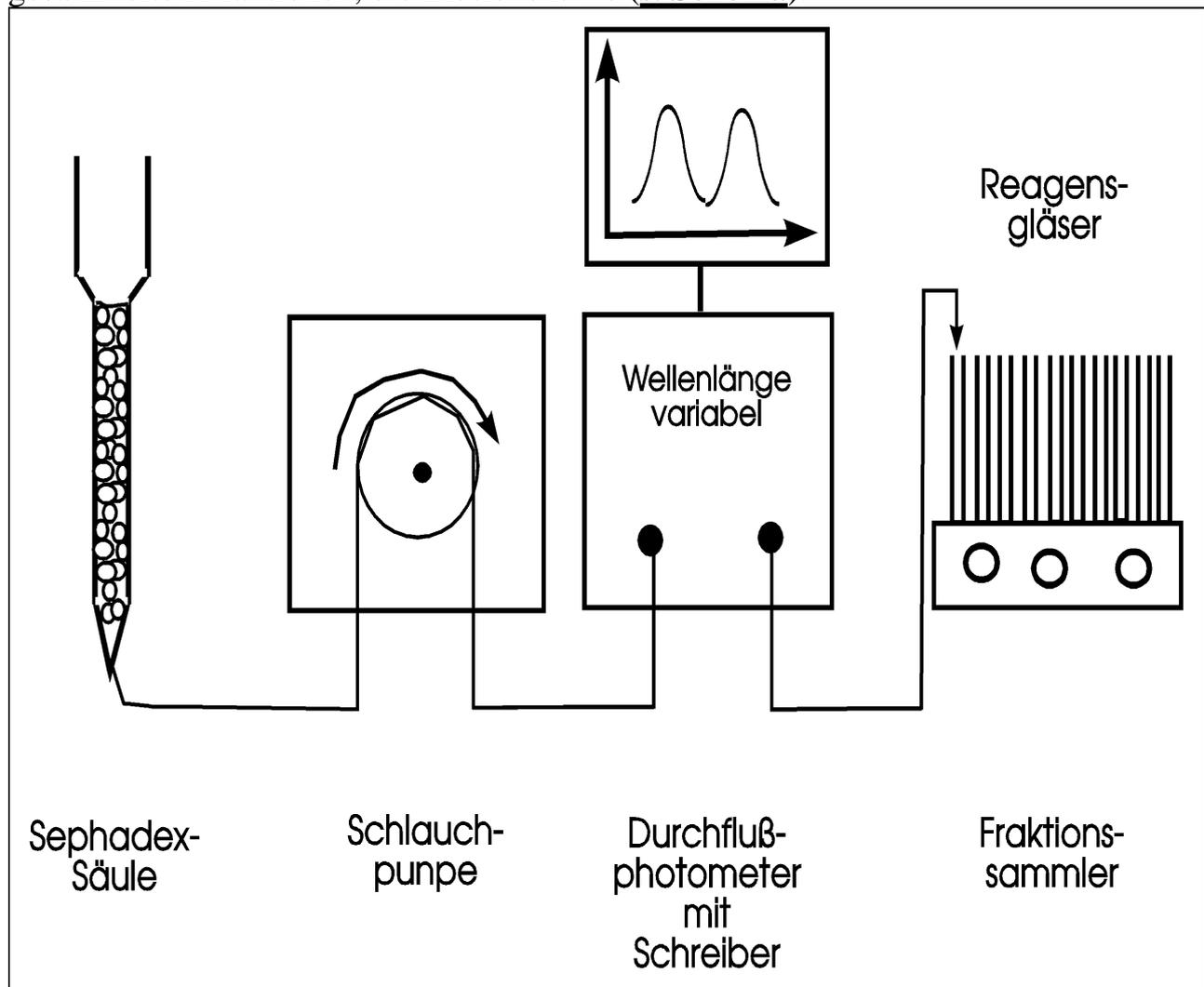
Modell zum Zeitverlauf der Elution dieser beiden Substanzen in einer Sephadex-G-25-Säule:



In unserem Fall soll RNA mit einem Molekulargewicht von >450000 von AMP (MG 450) mittels Phosphat-Puffer und Sephadex-G-25 getrennt werden. Dies bedeutet, daß RNA-Moleküle sich nur im äußeren Volumen der Säule aufhalten werden und

ihnen ein Zugang zum Gelnetzwerk verwehrt ist. Aus der Sephadex-Säule wird RNA demnach im Ausschluß-Volumen als erster Peak eluiert. Dagegen werden AMP-Moleküle in das Gelnetzwerk diffundieren und nach längerem Aufenthalt durch Phosphat-Ionen des Puffers aus dem Gelnetzwerk verdrängt und erst sehr viel später als zweiter Peak eluiert.

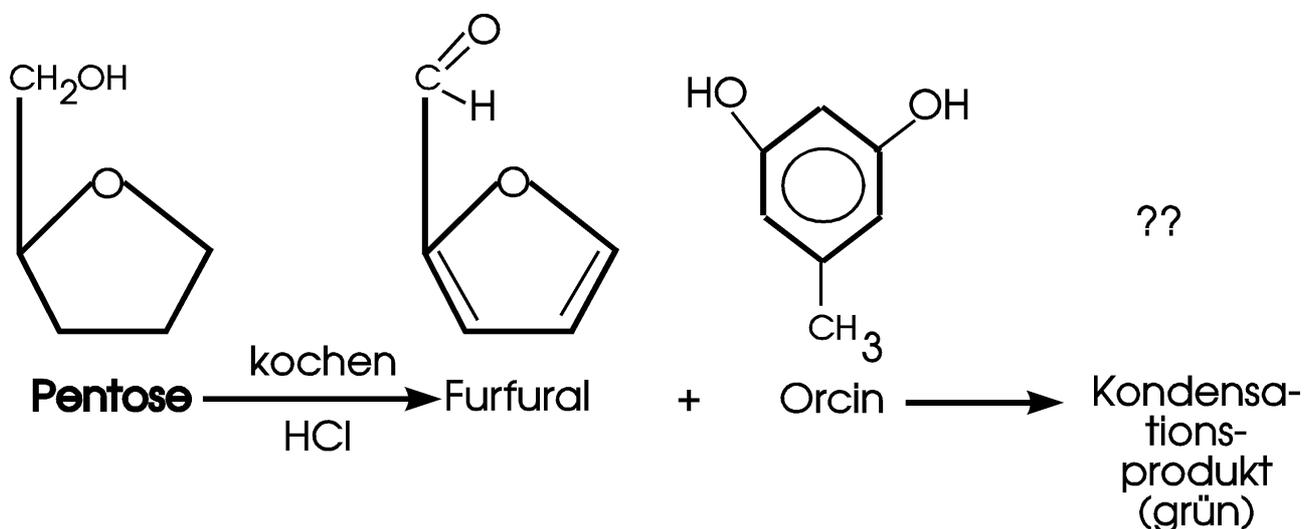
Das Verfahren der Gelfiltration ist im Labor ein unentbehrliches Hilfsmittel zur präparativen Trennung von Substanzen nach deren Molekulargewichten (Molekülgrößen). Es läßt sich mit einigem technischen Aufwand automatisch durchführen (s. u.), indem das Säulen-Eluat mittels Schlauchpumpe in einer wählbaren Durchflußrate abgesaugt und durch ein Durchflußfotometer bei variabler Wellenlängen-Einstellung und angeschlossenem Laborschreiber geleitet wird. Ein Fraktionensammler ermöglicht dabei die Sammlung einzelner Fraktionen in passenden Reagenzgläsern. Gerade bei der Untersuchung von Nukleinsäure- oder Protein-Extrakten kann das Sephadex-Eluat im Durchflußfotometer bei 250 (260) bzw. 280 nm kontinuierlich durchgemessen werden und man erhält, zugeordnet zu den gesammelten Fraktionen, die Elutionskurve (s. **Schema**).



Im Rahmen des Praktikums stehen derartige Geräte nicht zur Verfügung, so daß die Sammlung einzelner Eluat-Fractionen und deren Auswertung sehr zeitaufwendig durchgeführt werden müssen.

Nachweis-Reaktion für RNA und AMP:

Da mittels Sephadex eine Trennung dieser beiden Substanzen ermöglicht wird, kann deren fotometrischer Nachweis auf einer gemeinsamen Grundlage erfolgen. Wir verwenden die **Orcin-Nachweismethode**, die darauf beruht, daß die in beiden Substanzen enthaltenen Pentosen durch Kochen in Anwesenheit starker Säuren zu Furfural oxidiert werden (s. Reaktionsschema). Furfural ergibt mit Orcin ein grünes Kondensationsprodukt, dessen Extinktion gegen einen Blindwert gemessen wird.



Dabei ist zu beachten, bei Ansatz einer Eichkurve jeweils die zu bestimmenden Substanzen zu verwenden, da z.B. Desoxypentosen (in DNA) nur einen Bruchteil der bei RNA resultierenden Farbintensität mit Orcin ergeben.

B) Material und Geräte

B1) Erstellung von RNA- und AMP-Eichkurven

- RNA-Stammlösung in Puffer (Konzentration: **1000 µg/ml**);
- AMP-Stammlösung in Puffer (Konzentration: **100 µg/ml**);
- 100ml-Meßkolben zum Ansatz von 3 Eichlösungen unterschiedlicher Konzentration (s.u.);
- Phosphat-Puffer (pH 6.7) zum Ansatz der Eichlösungen;
- graduierte Reagensgläser (4ml);

- f) vorbereitetes Orcin-Reagens:
(0.1g Fe(II)Cl₂ wird in 100 ml 36%-iger HCl gelöst. Vor Gebrauch versetzt man diese Lösung mit 0.01 g Orcin/ml);
- g) Wasserbad bei 100°C;
- h) Fotometer bei 670 nm;

B2) Elution der Sephadex-G-25-Säule und Bestimmung der Menge an RNA und AMP im Säuleneluat

- a) bereits vorbereitete Sephadex-G-25-Säule;
- b) Phosphat-Puffer (pH 6.7) zur Elution;
- c) graduierte Reagensgläser (4ml);
- d) ungraduierte Reagensgläser;
- e) Orcin-Reagens:
(0.1g Fe(II)Cl₂ wird in 100 ml 36%-iger HCl gelöst. Vor Gebrauch versetzt man diese Lösung mit 0.01 g Orcin/ml);
- f) Wasserbad bei 100°C;
- g) Fotometer bei 670 nm;
- h) 2 10ml-Meßkolben zur Sammlung einzelner Sephadex-Fraktionen;
- i) Reinsubstanz-Probe mit RNA und AMP.

C) Durchführung

C1) Erstellung von RNA- und AMP-Eichkurven (jeweils 4 Studenten)

- a) Aus der RNA-Stammlösung 10, 5 und 2.5 ml mit sauberer Pipette in entsprechend beschriftete 100ml-Meßkolben pipettieren, mit Phosphat-Puffer zur Marke auffüllen, mit Stopfen verschließen und intensiv mischen. Wir erhalten 3 Eichlösungen mit den Konzentrationen von **100, 50 und 25 µg/ml RNA**.
- b) In gleicher Weise aus der AMP-Stammlösung 50, 25 und 5 ml in 3 weitere Meßkolben pipettieren. Dies ergibt 3 Eichlösungen mit einer AMP-Konzentration von **50, 25 und 5 µg/ml**.
- c) Nach guter Durchmischung dieser Eichlösungen pipettiert man aus jeder Eichlösung jeweils dreimal je 1 ml in ein graduiertes, beschriftetes Reagensglas, fügt je 1 ml Orcin-Reagens hinzu (**Pipettierhilfe verwenden!**) und kocht den Ansatz 45 Minuten im Wasserbad.

- d) Für die RNA- und AMP-Eichung ist je ein Blindwert aus 1 ml Phosphat-Puffer in einem graduierten Reagensglas anzusetzen und nach c) wie die Proben mit 1 ml Orcin-Reagens zu kochen.
- d) Nach Abkühlen der Reagensgläser unter fließendem Leitungswasser wird mit A. dest. zur Marke (=4 ml) aufgefüllt, gut gemischt und im Fotometer bei 670 nm gegen den Blindwert gemessen.
- e) Die gemessenen Extinktionswerte in die unter **D1) Auswertung** aufgeführte Tabelle eintragen.

C2) Sephadex-G-25-Gelfiltration von RNA und AMP und Bestimmung der RNA- und AMP-Konzentration

C2-A) Sephadex-Elution (8 Studenten)

- a) Zunächst wird der Puffer-Überstand über dem Sephadex-Gel vorsichtig mittels Pipette abgesaugt (**generell: Sephadex-Säule nie trocken laufen lassen! (s. Kationen-Austauscher-Trennung, Versuch 1, 1. AT)**).
- b) Nun 20 ml aus der RNA und AMP enthaltenden Probe-Lösung mit einer Pipette auf die Säule aufbringen, wobei die Probe vorsichtig an der Glasinnenwandung der Säule langsam ablaufen sollte, damit die Oberfläche des Sephadex-Gelbetts keinen "Krater" bekommt.
- c) Nun ein 10ml-Kölbchen unter den Säulenauslauf stellen und die Säule auf eine Tropfgeschwindigkeit von ca. 30 Tropfen/Min. einstellen.
- d) Ist das 10ml-Kölbchen bis zur Marke befüllt, das zweite Kölbchen unterstellen, den Inhalt des ersten in ein nummeriertes ungraduiertes Reagensglas entleeren u.s.w.
Während die ersten sechs 10ml-Fraktionen verworfen werden (noch keine RNA in Sicht!), sollten die Fraktionen **7 bis 50** auf RNA und AMP untersucht werden.
- e) Ist die Probe in die Sephadex-Säule eingedrungen, die Glaswand der Säule, die mit Probe in Berührung kam, dreimal mit Puffer nachspülen, wobei jedesmal die Spülflüssigkeit zuerst in die Säule eingedrungen ist, bevor man den nächsten Spülvorgang einleitet. Hierdurch wird verhindert, daß Proben-Bestandteile verschleppt werden und das Elutionsprofil darunter leidet.

f) Sind die drei Spülvorgänge abgeschlossen, wird die Säule mit genügend Puffer vorsichtig beschickt, wobei darauf zu achten ist, daß die Säule zwischenzeitlich nie trocken läuft.

C2-B) Konzentrationsbestimmung von RNA und AMP im Sephadex-Eluat

- a) Sind etwa 10 Sephadex-Fraktionen gesammelt (C2-A), je 1 ml aus jeder Fraktion in ein graduiertes Reagensglas mit gleicher Numerierung überführen, 1 ml Orcin-Reagens (**Pipettierhilfe!**) zusetzen und den Ansatz 45 Minuten im Wasserbad kochen.
- b) Zu diesem Ansatz auch einen Blindwert anstelle mit 1 ml des Säulen-Eluats mit 1 ml Phosphat-Puffer wie unter a) ansetzen.
- c) Die Proben unter fließendem Leitungswasser abkühlen, mit A. dest. zur Marke (=4ml) auffüllen, mischen und im Fotometer bei 670 nm gegen den Blindwert messen.
- d) Die gemessenen Extinktionswerte der Sephadex-Fraktionen in die vorbereitete Tabelle unter **D2) Auswertung** eintragen und die RNA- und AMP-Peaks nach dem dort angegebenen Schema weiter auswerten.

D) Auswertung

D1) Auswertung der Eichkurven für RNA und AMP

a) Die für die RNA- und AMP-Eichlösungen erhaltenen Extinktionen zunächst in die folgende vorbereitete Tabelle eintragen und die Eichfaktoren aus **Konzentration : Extinktions-Mittelwert** errechnen (s. folgende Tabelle):

Konzentration	RNA Extinktionen	Konzentration	AMP Extinktionen
100µg/ml	50µg/ml

Mittelwerte:

Konzentration	RNA Extinktionen	Konzentration	AMP Extinktionen
50µg/ml	25µg/ml
Mittelwerte:
Konzentration	RNA Extinktionen	Konzentration	AMP Extinktionen
25µg/ml	5µg/ml
Mittelwerte:

<u>Eichfaktoren (Konzentration : Mittelwert Extinktion):</u>			
Konzentration	RNA Extinktionen	Konzentration	AMP Extinktionen
100µg/ml	50µg/ml
50µg/ml	25µg/ml
25µg/ml	5µg/ml
<u>Mittlere Eichfaktoren:</u>

- b) Nun die Eichkurven für RNA und AMP zeichnen, wobei auf der Abszisse die Konzentrationen und auf der Ordinate die Extinktionen abzutragen sind.
- c) Beim Einzeichnen der Eichkurve mittels Lineal ergeben sich öfters Schwierigkeiten, wenn die Extinktionswerte nicht auf einer Geraden liegen. Hier kann man sich durch folgendes Vorgehen helfen:

Bei jeder kolorimetrischen Analyse muß die Eichkurve durch den Nullpunkt gehen, d.h. bei Konzentration 0 ist die Extinktion ebenfalls 0. Somit haben wir einen "Fixpunkt" für die Eichkurve (die Eichgerade ist ja durch 2 Punkte definiert!).

Der zweite Fixpunkt ergibt sich aus dem mittleren Eichfaktor (s. Tabelle). Durch Umstellung seiner Bestimmungsgleichung (**EF = Konzentration / Extinktion**) kann man zu einer bestimmten Konzentration die zugehörige Extinktion berechnen:

Ist z.B. der mittlere Eichfaktor 180.0, und will man die Extinktion für eine Konzentration von 100 µg/ml errechnen, so ergibt sich:

$$\underline{\underline{\mathbf{EF = Konzentration / Extinktion;}}}$$

$$180.0 = 100 \mu\text{g/ml} / \text{Extinktion;}$$

$$180.0 \cdot \text{Extinktion} = 100 \mu\text{g/ml;}$$

$$\underline{\underline{\mathbf{Extinktion = 100 \mu\text{g/ml} / 180.0}}}$$

$$\underline{\underline{\mathbf{Extinktion = 0,556.}}}$$

Somit wäre die Eichkurve vom 0-Punkt durch die Extinktion von 0.556 bei der Konzentration von 100 µg/ml zu ziehen.

- d) Mit den Mittelwerten der Eichfaktoren für RNA und AMP ist die Konzentration dieser beiden Substanzen in den gesammelten Sephadex-Fractionen zu bestimmen (s. D2)).

D2) Auswertung der Sephadex-Gelfiltration

- a) Die Extinktionen der einzelnen Sephadex-Fractionen nach Reaktion mit dem Orcin-Reagens können zunächst in die vorbereitete Tabelle (s.u.) eingetragen werden.
- b) Mit diesen Extinktionswerten ist ein Sephadex-Elutionsprofil zu zeichnen. Dabei auf der Abszisse die Fraktionsnummern und auf der Ordinate die zugehörigen Extinktionswerte eintragen.
- c) Anhand des Elutionsprofils wird unter Mithilfe der Betreuer entschieden, welche Fraktionen auf RNA und AMP entfallen.
- d) Mit den Mittelwerten der Eichfaktoren (s. D1) für RNA und AMP können nun die RNA- und AMP-Gehalte (pro ml aufgetragener Probe) in den zugehörigen

Sephadex-Fractionen nach den auf S. 55/56 aufgeführten Formeln berechnet werden.

<u>Fraktion</u>	<u>Extinktion</u>	<u>Fraktion</u>	<u>Extinktion</u>	<u>Fraktion</u>	<u>Extinktion</u>
7	25	43
8	26	44
9	27	45
10	28	46
11	29	47
12	30	48
13	31	49
14	32	50
15	33	51
16	34	52
17	35	53
18	36	54
19	37	55
20	38
21	39
22	40
23	41
24	42

<u>Extinktionen aller RNA-Fractionen =</u>	<u>.....</u>
<u>Extinktionen aller AMP-Fractionen =</u>	<u>.....</u>

$$\underline{\mu\text{g/ml RNA}} = \frac{\text{Extinktionen aller RNA-Fractionen} \cdot \text{EF(RNA)} \cdot 10}{20}$$

$$\underline{\mu\text{g/ml AMP}} = \frac{\text{Extinktionen aller AMP-Fractionen} \cdot \text{EF(AMP)} \cdot 10}{20}$$

In diesen Gleichungen beruht der **Faktor 10** darauf, daß jeweils nur 1 ml jeder Sephadex-Fraktion (Vol. = 10 ml) mit Orcin-Reagens versetzt wurde, und der **Faktor 20** auf dem auf die Sephadex-Säule aufgetragenen Probevolumen von 20 ml.

e) Die RNA- und AMP-Konzentration in 1 ml der aufgetrennten Probe beträgt somit:

$$\underline{\mu\text{g/ml Probe RNA}} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\underline{\mu\text{g/ml Probe AMP}} = \underline{\hspace{2cm}}$$

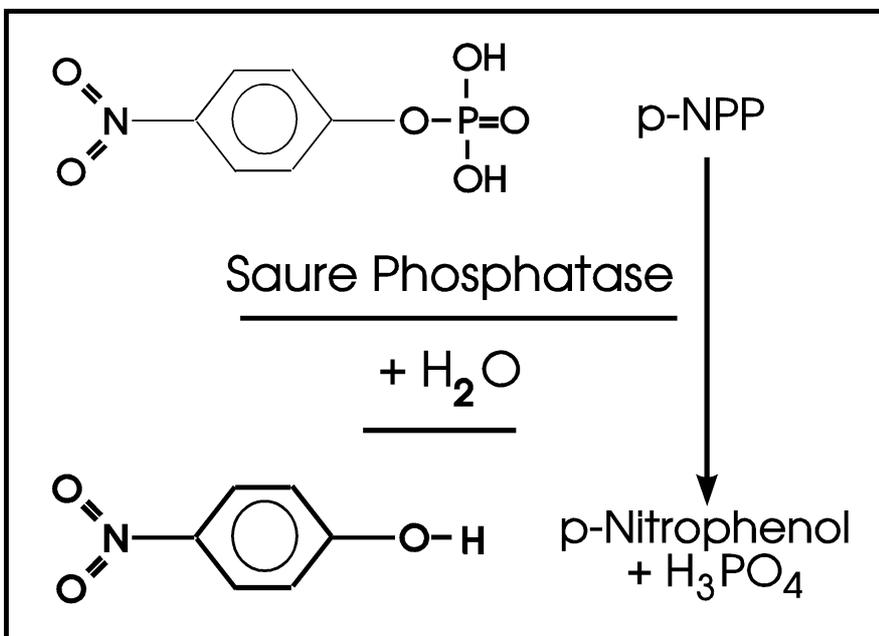
3. Arbeitstag

Versuche zum Einfluß von pH, Reaktionsdauer und Substrat-Konzentration auf die Enzymaktivität am Beispiel der sauren Phosphatase (aus Kartoffeln) mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat.

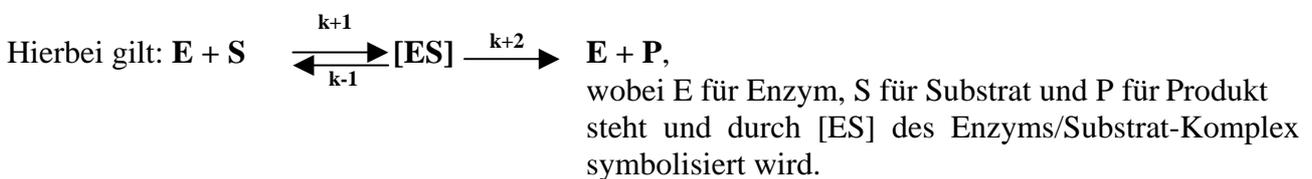
- Versuchsziel: Charakterisierung eines Enzyms in Hinblick auf:
- a) Enzymaktivität und Reaktionsdauer;
 - b) Enzymaktivität und pH-Wert des Mediums;
 - c) Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration und Bestimmung von V_{max} und K_M .

A) Prinzip:

Die saure Phosphatase spaltet p-Nitrophenylphosphat (p-NPP) nach der Gleichung:



Weder p-NPP (Substrat) noch p-Nitrophenol (Produkt) absorbieren im sichtbaren Wellenlängen-Bereich. Erst nach Bildung des Na-Ions (im alkalischen Bereich) hat p-Nitrophenol ein Absorptionsmaximum bei 405 nm.



B) Reagentien für alle Versuche zur Enzym-Kinetik:

- a) 1N NaOH;
- b) 0.1N NaOH;
- c) Citrat-Puffer (0.1M, pH 5.6):
 21.0g Citronensäure(x1 H₂O) in ca. 200ml A. dest. lösen,

200ml 1N NaOH(a) zugeben und mit A. dest ad 1 Liter auffüllen;

Davon 69ml mit 31ml 0.1N NaOH(b) mischen.

d) p-Nitrophenylphosphat-Lösung (60mM):

2.33g p-NPP in A. dest. lösen und mit A. dest. ad 100ml auffüllen.
(Lösung bei 0°C ca. 2 Wochen haltbar!);

e) p-Nitrophenylphosphat-Lösung (20mM) für Versuch 4!:

0.777g p-NPP in A. dest. lösen und A. dest. ad 100ml auffüllen.
(Lösung bei 0°C ca. 2 Wochen haltbar!);

f) Serum-Albumin-Lösungen:

1) 4%-ig in Citrat-Puffer (c);

2) 1%-ig in Citrat-Puffer (c);

g) Saure Phosphatase (Lyophilisat aus Kartoffeln):

(stabilisiert mit Serum-Albumin)

Stammlösung:

1 mg Lyophilisat wird in 2ml kalter 4%-iger Albumin-Lösung (f1) gelöst.

Vor Kursbeginn Herstellung einer Verdünnung aus 0.2ml Stammlösung,

1%-ige Albumin-Lösung (f2) ad 10 ml.

(Stabilität bei 0°C begrenzt!!)

h) Citrat-Puffer (0.1M, pH 2.0);

i) Citrat-Puffer (0.1M, pH 4.0);

j) TRIS - HCl - Puffer (0.1M, pH 8.0);

k) Eis bzw. Kühlschrank zum Zwischenlagern von Enzym- und Substrat-Lösungen;

l) Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm;

m) Thermostaten (30°C).

C) Durchführung

C-1) 1. Versuch: Enzymatische Spaltung von p-Nitrophenylphosphat durch Saure Phosphatase in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (bei Substrat-Überschuß!)

a) Versuchsansatz

Enzym-Konzentrationsstufe 1 oder 2 (Bitte ankreuzen!)						
Reagentien	Reagens-Zusatz (ml) zu den Proben:					
	1	2	3	4	5	6
Citrat-Puffer (c)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
A. dest.	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
p-NPP (d)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Im Wasserbad bei 30°C 5 min vortemperieren						
Saure Phosphatase (g) V_e :	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
mischen, weiter inkubieren bei 30°C						
1N NaOH (a)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Zugabe nach Minuten:	0	10	20	30	40	50
Ges.-Volumen V_t :	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

b) Messung der Extinktionen aller Proben gegen A. dest. bei 405 nm

	Extinktionen der Proben:					
	1	2	3	4	5	6
Extinktionen:

D-1) Auswertung

a) Errechnung der Extinktions-Differenzen (ΔE) für die Proben-Nr. 2 bis 6 gegen den Zeit-Blindwert (=Probe-Nr. 1):

Proben-Nummer:	2	3	4	5	6
Reaktions-Zeit (Min.):	10	20	30	40	50
Extinktions-Differenz (ΔE):

b) Auftragen der ΔE -Werte in Abhängigkeit der Reaktionszeit in ein Zeit-Umsatz-Diagramm.

c) Bestimmung der Enzymaktivität der Sauren Phosphatase jeder Probe anhand der ΔE -Werte (s. Abschnitt D-1A):

Proben-Nummer:	2	3	4	5	6
Reaktions-Zeit (Min.):	10	20	30	40	50
Extinktions-Differenz (ΔE):
Enzym-Aktivität (Units/ml):

D-1A) Zur Berechnung der Enzym-Aktivität wird das LAMBERT-BEER'sche Gesetz verwendet (Wiederholung):

$$\text{Log}(I_0/I) = \text{Extinktion} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Dabei bedeuten: **c** = Konzentration (Mol/Liter);

d = Schichtdicke der Küvette (in cm)

ϵ = Stoff-spezifische Proportionalitätskonstante bei definierter Wellenlänge (= "molarer Extinktions-Koeffizient")
 (= Extinktion einer 1Mol pro Liter enthaltenden Substanz-Lösung bei der Schichtdicke 1cm)

Ist **ϵ** bekannt, läßt sich aus der Extinktion einer Testlösung deren Konzentration berechnen:

$$c \text{ (Mol/Liter)} = \text{Extinktion} / (\epsilon \cdot d)$$

Oft erfolgt noch eine Verdünnung der zu messenden Substanz im Reaktionsansatz. Um die Ausgangs-Konzentration der Substanz in der Probe berechnen zu können, muß noch ein Verdünnungs-Faktor eingesetzt werden:

$$c \text{ (Mol/Liter)} = (\text{Extinktion} \cdot V_t) : ((\epsilon \cdot d \cdot V_e)),$$

wobei **V_t** das Gesamt-Volumen des Testansatzes und **V_e** das Volumen der eingesetzten Probe sind.

Für die Enzym-kinetischen Versuche des 3. Arbeitstages gilt:

$$\epsilon \text{ (p-NPP)} = 18500 \text{ (Liter/Mol} \cdot \text{d) (bei 405 nm), wobei}$$

$$\mathbf{d = 1 \text{ cm.}}$$

Damit erhält man endlich die vollständige Bestimmungsgleichung zur Konzentrations-Berechnung von p-NPP:

$$\mathbf{c \text{ (Mol/Liter)} = (\Delta E \cdot V_t) / (18500 \cdot 1 \cdot V_e), \text{ bzw.}}$$

$$\mathbf{c \text{ (mMol/ml)} = (\Delta E \cdot 6.0) / (18500 \cdot 1 \cdot 0.2)}$$

Nun muß noch die Umrechnung von mMol/ml in μ Mol/ml erfolgen und die Reaktionszeit berücksichtigt werden, da die Einheit für die Enzym-Aktivität (Unit (U)) definiert ist als ¹⁾:

$$\mathbf{\underline{Enzym-Aktivität (U/ml Probe)} = \mu\text{Mol Produkt} / (\text{ml} \cdot \text{t})}$$

$\mathbf{t = \text{Reaktionszeit in Minuten}}$

Die **Enzymaktivität** der Sauren Phosphatase und damit **V** (Umsatzgeschwindigkeit) ist somit aus folgender Gleichung zu berechnen:

$$\mathbf{\underline{Enzym-Aktivität (U/ml Probe)} = V =}$$

$$\mathbf{= (\Delta E \cdot 6.0 \cdot 1000) / (18500 \cdot 1 \cdot 0.2 \cdot t)}$$

(Der Faktor 1000 resultiert dabei aus der Umrechnung **von mMol/ml in μ Mol/ml**)

D-1B) Erklärungen zu diesem Versuch

Bei der Zeit-Umsatz - Kurve unterscheidet man gemäß **Abb. 7.D-1B** im allgemeinen drei Kurven-Bereiche:

Bereich A:

In diesem Bereich ist der Enzym/Substrat-Komplex noch nicht vollständig aufgebaut. Er wird "presteady state" genannt.

1) Die neue Einheit für die Enzym-Aktivität ist das Katal (kat). Sie ist definiert als die Enzym-Aktivität, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt. 1 U entspricht 16.67 nkat. Da die Einheit „Unit“ noch in Gebrauch ist (Biochemikalien-Firmen etc.), soll sie in diesem Praktikum auch noch verwendet werden.

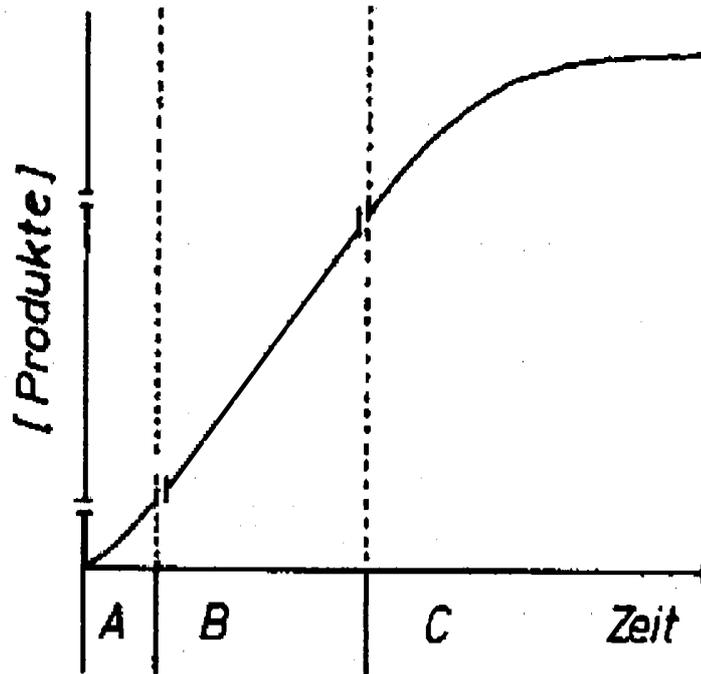


Abb. 7.D-1B: (Aus: J. ABLERS, A. ARNOLD, Fr. R. von DÖHREN u. H.W. PETER: Enzymkinetik
2. Auflg., G. Fischer, Stuttgart, New York, 1982; S. 40)

Meist ist dieser Bereich der Zeit-Umsatz - Kurve jedoch analytisch schwer faßbar, da er nur Sekunden dauert (in obiger Abbildung überzeichnet!).

Bereich B:

In diesem Bereich ist der Enzym/Substrat-Komplex vollständig aufgebaut. Er wird "steady state"-Bereich genannt. Die Reaktionsgeschwindigkeit (V) für den Substrat-Umbau bzw. für die Produkt-Bildung ist hier konstant:

$$V = -d(S)/dt = d(P)/dt = \text{konstant!}$$

(S) = Substrat-Konzentration; (P) = Produkt-Konzentration

Bereich C:

Dieser Bereich kann asymptotisch verlaufen, wenn

- 1.) entweder ein Großteil des Substrates bereits verbraucht ist,
- 2.) oder die Konzentration an entstehendem Produkt so groß ist, daß entweder die Bildung oder der Zerfall des Enzym/-Substrat-Komplexes verhindert wird.

Wie **Abb. 7.D-1C** zeigt, können Zeit-Umsatz-Kurven prinzipiell folgenden Verlauf nehmen

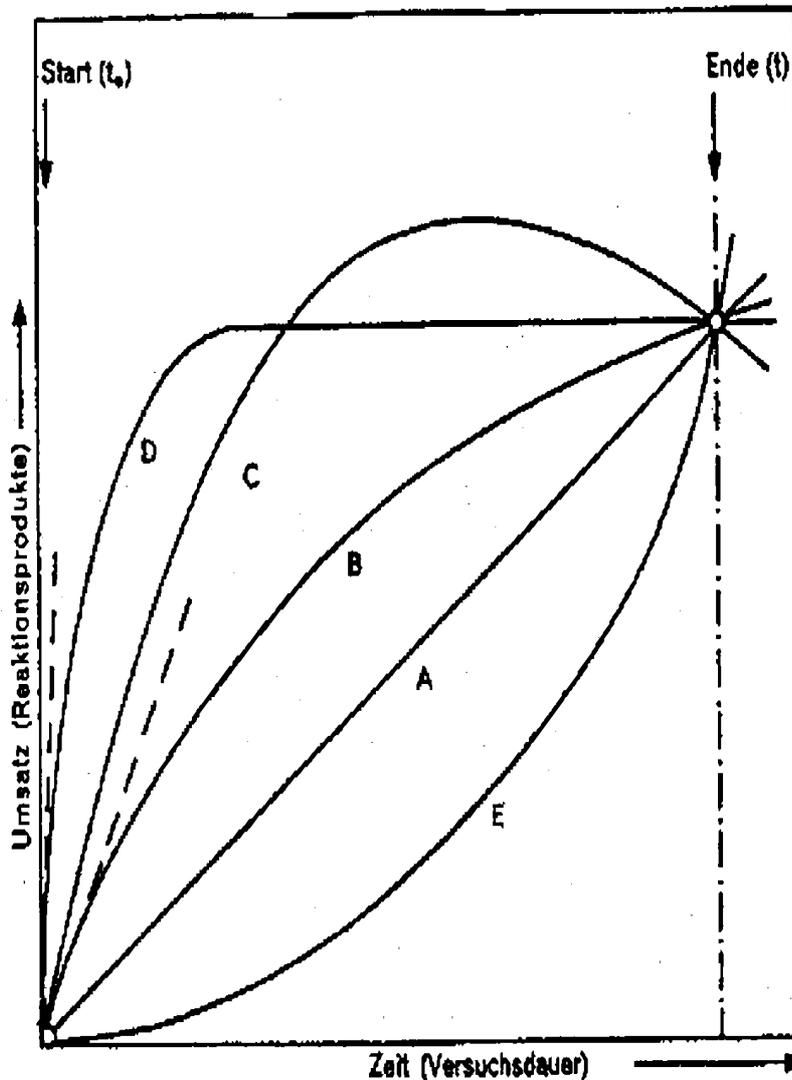


Abb. 7.D-1C:

(Aus: H. AEBI: Einführung in die praktische Biochemie
Akad. Verlagsges. FFM, 1965; S. 302)

Erläuterungen zu Abb. 7.D-1C:

Fall A: linearer Verlauf;

Fall B: Fortschreitende Reaktionsverzögerung (Reaktion 1. Ordnung);

Fall C: Störung der Testreaktion durch entgegengesetzt verlaufende Umsetzung;

Fall D: Vorzeitiges Erreichen der Bedingungen wie in **Abb. 7.D1-B**, Bereich

Fall E: Autokatalytischer Kurvenverlauf

C-2) 2. Versuch: Enzymatische Spaltung von p-Nitrophenylphosphat durch Saure Phosphatase in Abhängigkeit von der Enzym-Konzentration (bei Substrat-Überschuß!)

a) Versuchsansatz

Reagentien	Reagens-Zusatz (ml) zu den Proben:				
	1	2	3	4	5
Citrat-Puffer (c)	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
A. dest.	2.95	2.95	2.90	2.85	2.80
p-NPP (d)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Im Wasserbad bei 30°C 5 min vortemperieren					
Saure Phosphatase (g) V_e :	0.05	0.05	0.10	0.15	0.20
mischen, weiter inkubieren bei 30°C					
1N NaOH (a)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Zugabe nach Minuten:	0	30	30	30	30
Ges.-Volumen (ml) V_f :	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00

b) Messung der Extinktion aller Proben gegen A. dest. bei 405 nm in 1cm-Küvetten

	Extinktionen der Proben:				
	1	2	3	4	5
Extinktionen:

D-2) Auswertung

a) Errechnung der Extinktions-Differenzen (ΔE) für die Reagensgläser Nr. 2 bis 5 gegen den Enzym-Konzentrations-Blindwert (=Reagensglas Nr. 1):

Proben-Nummer:	2	3	4	5
ml Enzym-Lösung V_e :	0.05	0.10	0.15	0.20
Extinktions-Diff. (ΔE):

b) Auftragen der ΔE -Werte in Abhängigkeit von der Enzym-Menge (=ml Enzym-Lösung) in ein Enzym-Konzentrations-Umsatz-Diagramm.

c) Bestimmung der Enzymaktivität der Sauren Phosphatase jeder Probe anhand der berechneten ΔE -Werte:

Proben-Nummer:	2	3	4	5
ml Enzym-Lösung (=V_e!):	0.05	0.10	0.15	0.20
Extinktions-Diff. (ΔE):
Enzym-Aktivität (U/ml):

Enzym-Aktivität (U/ml Probe) =

= ($\Delta E \cdot 6.0 \cdot 1000$) ($18500 \cdot 1 \cdot V_e \cdot t$)

(s. Erläuterungen unter Punkt D-1A!, s.S. 60)

C-3) 3. Versuch: Enzymatische Spaltung von p-Nitrophenylphosphat durch Saure Phosphatase in Abhängigkeit vom pH-Wert der Inkubationslösung (bei Substrat- und Enzym-Überschuß)

a) Versuchsansatz

pH-Wert: Puffer:	2.00 Citrat (h)	4.00 Citrat (i)	5.60 Citrat (c)	8.00 TRIS (j)
Proben-Nr.:	<u>1</u> <u>2</u>	<u>3</u> <u>4</u>	<u>5</u> <u>6</u>	<u>7</u> <u>8</u>
<u>Volumen (ml):</u>				
a) Puffer	0.8	0.8	0.8	0.8
b) A. dest.	2.9	2.9	2.9	2.9
c) p-NPP (d)	0.2	0.2	0.2	0.2

Im Wasserbad bei 30°C 5 Min. vortemperieren

Enzymlösung:	0.1	0.1	0.1	0.1
Start (Uhrzeit)

Mischen, weiter inkubieren bei 30°C

MI 1N NaOH (a) nach Minuten:	2.0	2.0	2.0	2.0
	0 30	0 30	0 30	0 30
Ges.-Vol. des Ansatzes (ml)	6.0	6.0	6.0	6.0

b) Messung der Extinktionen

c) der Proben bei 405 nm,

diesmal nicht gegen A. dest., sondern:

- Probe 2 gegen Probe 1
- Probe 4 gegen Probe 3
- Probe 6 gegen Probe 5
- Probe 8 gegen Probe 7

Proben-Nr.:	<u>1</u> <u>2</u>	<u>3</u> <u>4</u>	<u>5</u> <u>6</u>	<u>7</u> <u>8</u>
Extinktionen gegen die je- weiligen Kon- trolle

D-3) Auswertung

- a) Auftragen der Extinktionswerte in ein Umsatz-Diagramm in Abhängigkeit vom pH-Wert und Ermittlung des pH-Optimums für die Saure Phosphatase.

Das pH-Optimum der Sauren Phosphatase liegt nach unserem Versuch bei:

.....

C-4) 4. Versuch: Enzymatische Spaltung von p-Nitrophenylphosphat durch Saure Phosphatase in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration (p-NPP) zur Ermittlung des K_m -Wertes (ohne Einfluß von Hemmfaktoren)

Während bei den Versuchen 1-3 jeweils bei Substrat-Überschuß gearbeitet wurde, wird die Konzentration der Substratstammlösung (e) in diesem Versuch von 60 auf 20 mM zunächst vermindert und dann stufenweise erhöht.

(Anmerkung: Da p-Nitrophenylphosphat in wässriger Lösung bereits bei 30°C spontan hydrolysiert werden kann, ist bei jeder Substrat-Konzentrationsstufe jeweils ein Kontrollwert mit anzusetzen!)

Versuchsansatz

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ml Puffer (c)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
A.dest	3.09	3.09 +0.10	3.08	3.08 +0.10	3.06	3.06 +0.10	3.03	3.03 +0.10	3.00	3.00 +0.10	2.90	2.90 +0.10	2.80	2.80 +0.10	2.70	2.70 +0.10
p-NPP (e)	0.01	0.01	0,02	0.02	0.04	0.04	0.07	0.07	0.10	0.10	0.20	0.20	0.30	0.30	0.40	0.40

Im Wasserbad bei 30°C 5 Min. Vortemperieren

Enz.-Lösung. (g)	0.10	-----	0.10	-----	0.10	-----	0.10	-----	0.10	-----	0.10	-----	0.10	-----	0.10	-----
Start (Uhr-Zeit)

Sofort nach Enzym-Zugabe (=Start) mischen, Zeit notieren und weiter inkubieren bei 30°C

D-4C) Erläuterungen zu diesem Versuch anhand eines Beispiels:

In Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration habe sich z.B. folgender Produkt-Umsatz (V in U/ml) ergeben:

(S) (mMol) (X-Achse):	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0	10.0
V (U/ml) (Y-Achse):	0.68	1.02	1.68	2.02	2.32	2.56

Diese Ergebnisse werden zunächst in MICHAELIS-MENTEN-Darstellung aufgetragen (s. **Abb. 7.D-4C-1**). Es wird ersichtlich, daß aus dieser Art der Darstellung Informationen über die Größe von K_m und V_{max} nur annähernd abzuleiten sind.

Die Ermittlung von K_m und V_{max} ist durch die Auftragung nach LINEWEAVER-BURK zu erreichen. Hierzu werden zunächst die reziproken Werte von V und [S] errechnet:

1 / [S] (mMol):	5.00	2.50	1.00	0.50	0.25	0.10
1 / V (U/ml):	1.47	0.98	0.60	0.50	0.43	0.39

Die LINEWEAVER-BURK-Auftragung erfolgt so, daß 1/[S] auf der X-Achse und 1/V auf der Y-Achse abgetragen werden (s. **Abb. 7.D-4C-2**). Diese Abbildung zeigt, daß dadurch eine Linearisierung der Abhängigkeit beider Größen von einander zu erreichen ist.

Zu Abb. 7.D-4C-2: Ermittlung von K_m und V_{max}

Durch die Meßpunkte muß nun eine Ausgleichsgerade gelegt werden. Dies kann, falls die Werte es zulassen, entweder per Hand erfolgen oder durch lineare Regression von 1/V auf 1/(S).

Die lineare Regressionsanalyse ergab für dieses Beispiel folgende Geradengleichung, wobei $Y = 1/V$ und $X = 1/[S]$:

$Y = a + b \cdot X$ $Y = 0.38131 + 0.221938 \cdot X$
--

Definitionsgemäß ist der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Y-Achse ($1/V$) der Wert für $1/V_{\max}$ und der Schnittpunkt mit der X-Achse ($1/[S]$) der Wert für $-1/K_M$:

Die Regressions-Gerade schneidet die Y-Achse also bei $X=0$.

$$\text{Somit ergibt sich: } Y = 0.38131 + 0.221938 \cdot 0$$

$$\underline{Y = 1/V_{\max} = 0.38131} \text{ (=a der Repr.-Gleichung!).}$$

$$\underline{V_{\max} = 1 / 0.38131}$$

$$\underline{V_{\max} \text{ ist demnach } 2.62 \text{ U/ml.}}$$

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse ergibt sich, wenn $Y = 0$ gesetzt wird:

$$Y = 0.38131 + 0.221938 \cdot X$$

$$0 = 0.38131 + 0.221938 \cdot X$$

nach X aufgelöst, ergibt sich:

$$0.221938 \cdot X = -0.38131$$

$$X = -0.38131 / 0.221938$$

$$\underline{X = -1.718}$$

$$\underline{-1/K_M = -1.718; \quad 1/K_M = 1.718}$$

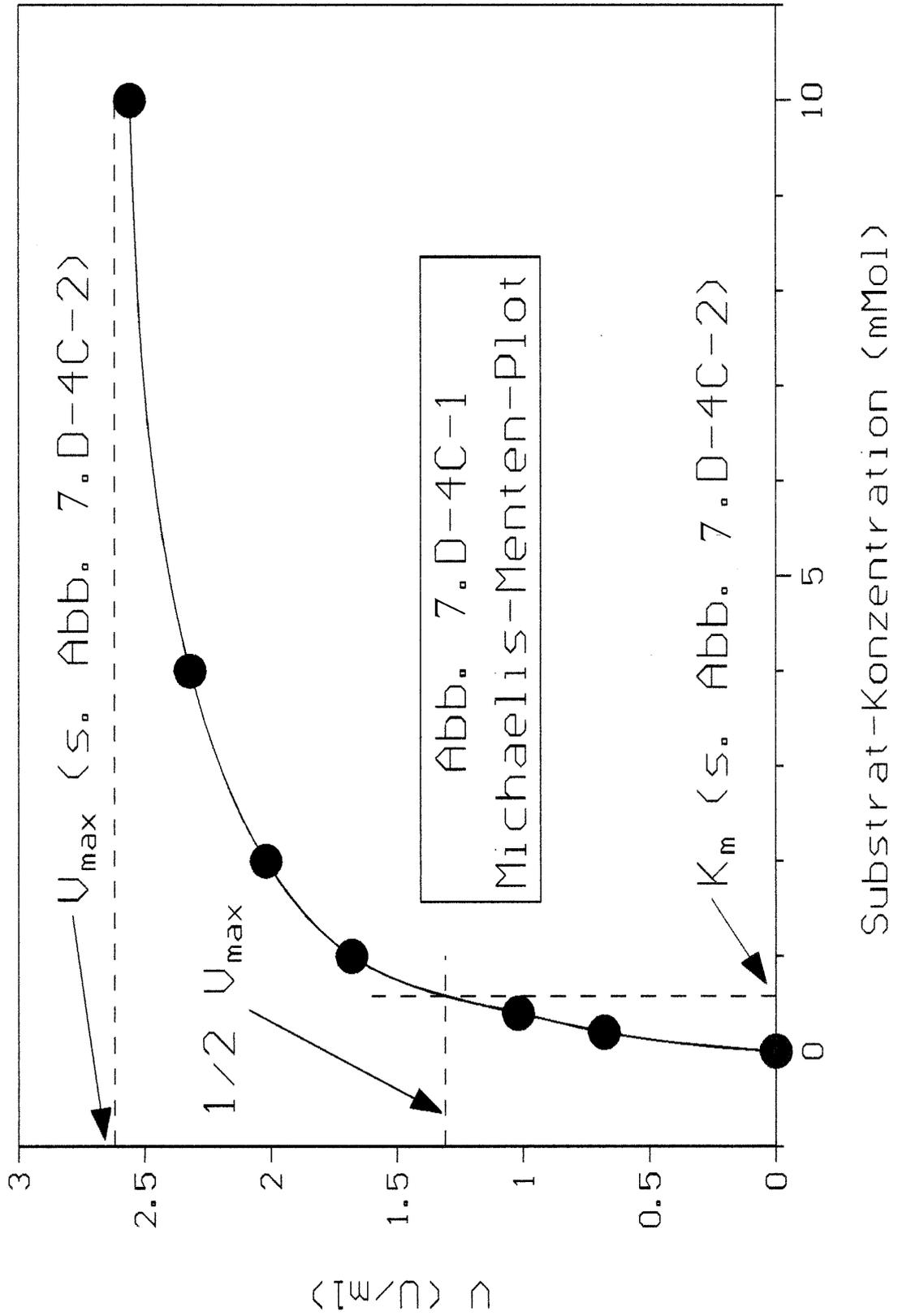
Somit ergibt sich ein K_M -Wert von 0.582 mMol Substrat

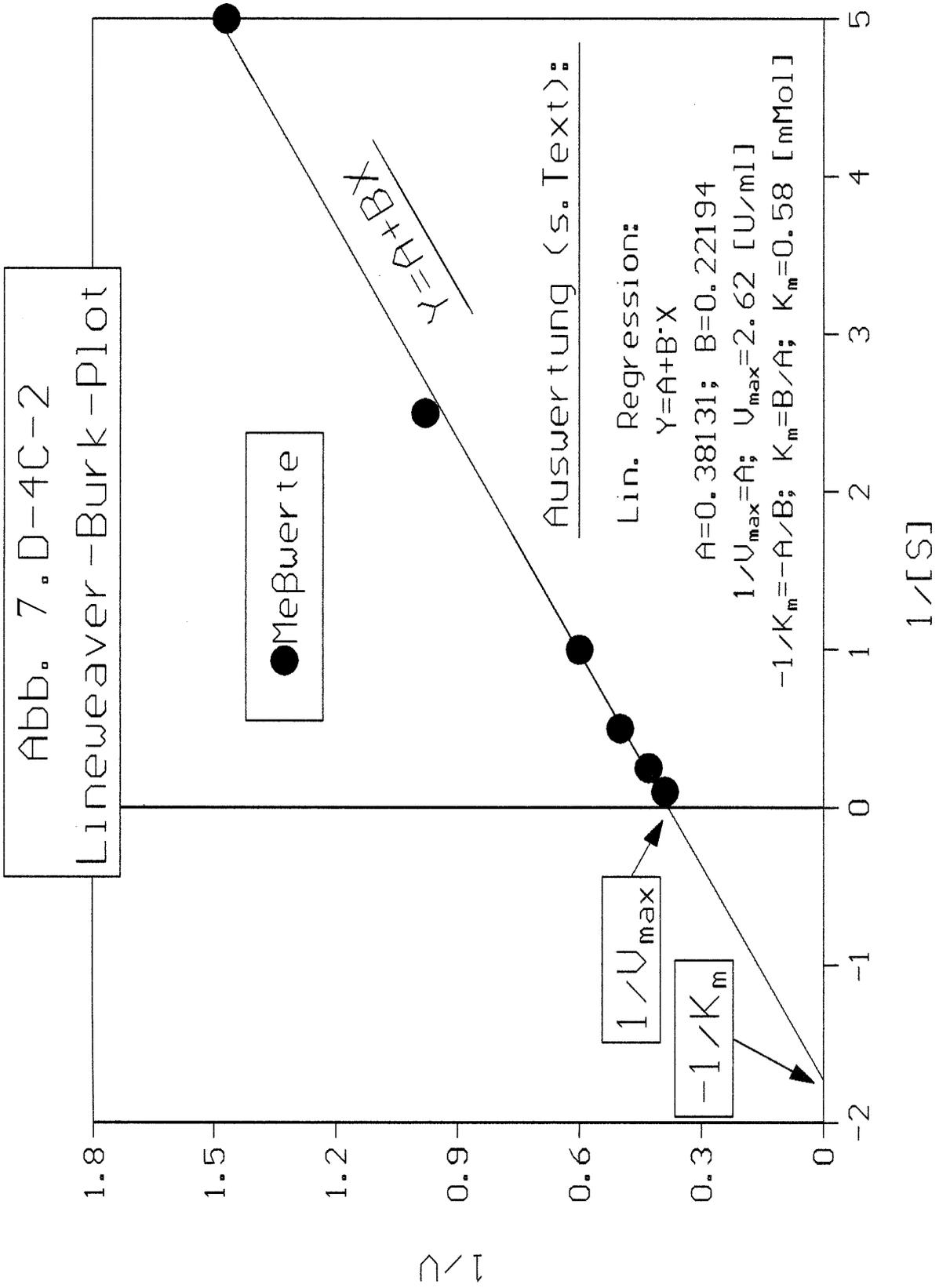
Anmerkung:

Die Michaelis-Konstante K_M ist die Substrat-Konzentration bei halb-maximaler Reaktionsgeschwindigkeit des Substrat-Umsatzes durch ein Enzym. Sie ist somit ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem bestimmten Substrat.

Ist K_M hoch, so besteht eine geringe Affinität des Enzyms zum Substrat; bei niedrigem K_M liegt dagegen hohe Affinität zum Substrat vor. Werden einem Enzym mehrere Substrate mit unterschiedlichen K_M -Werten angeboten, so werden vornehmlich die Substrate umgesetzt, zu denen das Enzym eine höhere Affinität aufweist (=kleinere K_M -Werte!).

Im allgemeinen liegen K_M -Werte im Bereich von 10^{-2} bis 10^{-6} Mol.





E) Literatur

AHLERS, J., A. ARNOLD, R. von DÖHREN u. H.W. PETER (1982): Enzymkinetik.
G. Fischer, Stuttgart

BERGMAYER, H.U. (1974): Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. I und II.
Verlag Chemie, Weinheim

MATTENHEIMER, H. (1971): Die Theorie des enzymatischen Tests.
Boehringer Mannheim GmbH

STRYER, L. (1994): Biochemie.
2. korr. Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag

VOET, D. u. J.G. VOET (1992): Biochemie.
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

4. Arbeitstag

(Fortführung von Versuch 5, 2.AT, s.S. 41):

Quantitative Auswertung der zwei-dimensionalen Papierchromatografie der Aminosäure-Fraktion von **Versuch 1, 1. AT (s.S. 11)**.

A) Prinzip

Die im Institut zwischenzeitlich chromatografierten Aminosäuren sind zunächst unter standardisierten Bedingungen anzufärben, bevor ihre quantitative Bestimmung erfolgen kann.

Hierfür wird die Ninhydrin-Reaktion (s. z.B. Karlson et al., 1994) verwendet. Sie verläuft dann quantitativ ab, wenn die Chromatogramme in einen Äthanol-gesättigten Tank (**wasserfrei!**) unter CO₂-Atmosphäre (**ohne O₂!**) bei 60°C 45 Minuten lang eingehängt werden. Ninhydrin reagiert mit einzelnen Aminosäuren unter Bildung AS-spezifischer Farbtönung, die aus dem Chromatografie-Papier zu eluieren und gegen einen Blindwert zu messen ist. Anhand von Chromatogrammen mit definierten Aminosäure-Konzentrationen wurden Eichfaktoren für die einzelnen Aminosäuren über lineare Regressionsanalysen ermittelt, so daß deren quantitative Auswertung möglich ist (**s. D) Auswertung**).

Allerdings sind noch einige Angaben über das Verfahren der Auswertung erforderlich:

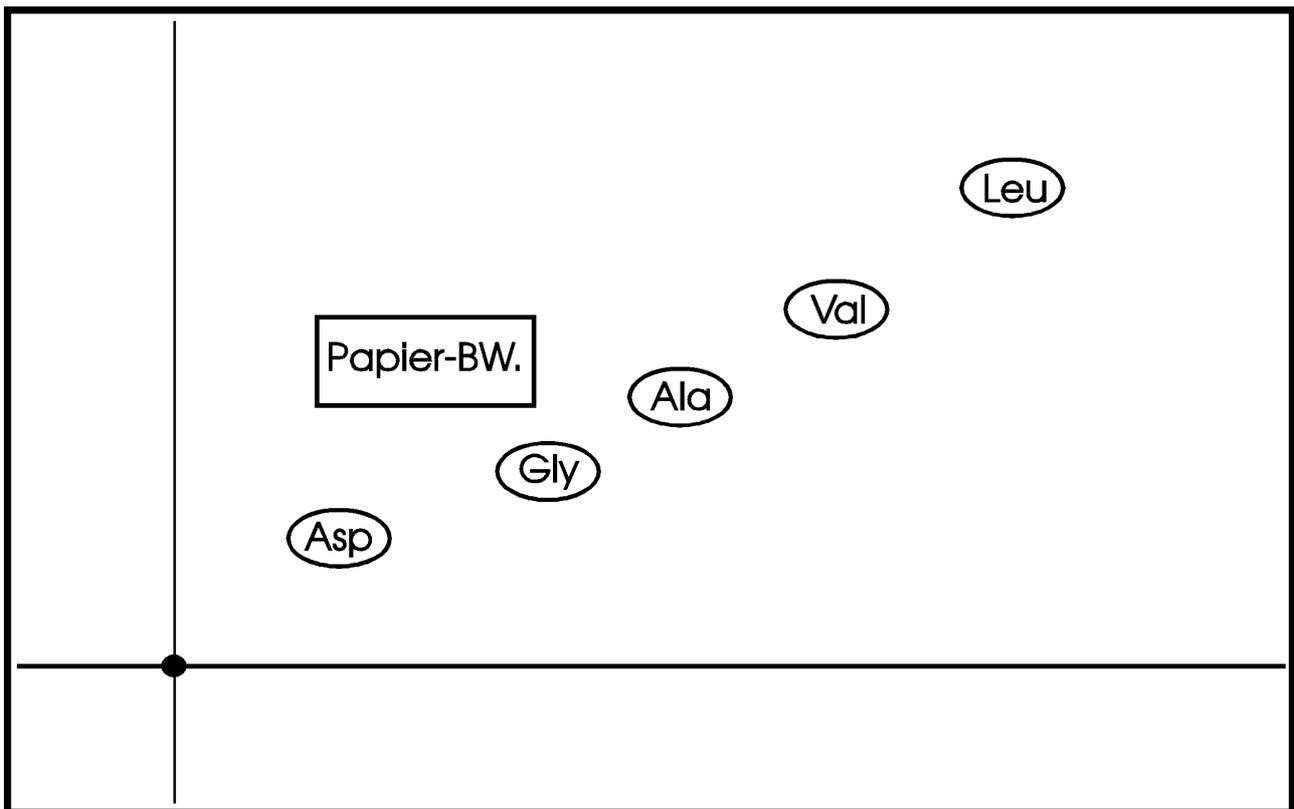
Ninhydrin reagiert nicht nur mit Aminosäuren, sondern auch mit Luftverunreinigungen, die über die Laboratmosphäre mit dem Chromatografie-Papier in Berührung gekommen sind (z.B. Zigarettenrauch!). Daher muß ein Verfahren zur Kompensation der in jedem Labor unterschiedlich hohen Untergrundfärbung des Chromatografie-Papiers gefunden werden.

Hierzu wird an einer bestimmten Stelle der Chromatogramme ein Papier-Blindwert zusammen mit den einzelnen Aminosäure-Flecken ("Spots") ausgeschnitten, seine Ninhydrin-Färbung über die Elution und Extinktionsmessung miterfaßt und seine Untergrund-Farbtintensität auf seine „Fläche“ bezogen. Da die Dicke von Chromatografie-Papier sehr konstant ist, entspricht die Fläche dem Gewicht des ausgeschnittenen Papier-Blindwerts. In Anbetracht unterschiedlicher Fleckgrößen (=Gewicht) bei den einzelnen Aminosäuren ist es somit möglich, von der Farbtintensität einzelner Aminosäuren pro Fleck-Gewicht die Farbtintensität des Papieruntergrunds pro Gewicht zu subtrahieren, wodurch die um die Untergrund-

Färbung des Papiers bereinigte, konzentrationsabhängige Ninhydrin-Färbung für jede Aminosäure zu ermitteln ist (s. **D) Auswertung**).

Anhand von Eichchromatogrammen können die in diesem Versuch zu bestimmenden Aminosäuren entsprechend folgendem Schema, s.a. **R_f-Wert, Versuch 4, S. 37** und **Versuch 5, S. 41**) lokalisiert werden:

Papier-Chromatogramm



B) Material und Geräte

a) entwickelte AS-Chromatogramme;

b) Ninhydrin-Reagens:

1% Ninhydrin mit 2% Colidin-Lutidin-Wasser (1:2:3) in 97% Äthanol abs. am Tag der Färbung in brauner Flasche ansetzen.

c) Anfärbetank, mit Äthanol abs. gesättigt, mit CO₂-Flasche und Temperatur-Kontrolle (60°C), Halterung für Chromatogramme;

d) Lichtplatte;

e) Waage (3 Nachkommastellen);

f) Schere;

g) Pinzette;

- h) Reagensgläser
- i) 50% Äthanol zur Elution;
- j) Fotometer bei 578 nm.

C) Durchführung (jeweils 4 Studenten)

- a) Bereits vor Beginn des Praktikums wird aus Zeitgründen die Anfärbung der Chromatogramme eingeleitet bzw. durchgeführt. Hierzu werden die Chromatogramme mit Ninhydrin-Reagens besprüht und gesättigt, kurz durch schwenken in der Luft getrocknet und in den Anfärbetank (**erklären lassen!**) eingehängt. Bei 60°C unter einer mit Äthanol abs. und CO₂ gesättigten Kammer verläuft die Ninhydrin-Reaktion mit Aminosäuren quantitativ (**s. A**).
- b) Nach 45 Minuten werden die Chromatogramme ca. 7 Minuten unter dem Abzug getrocknet (Colidin-Lutidin zur Stabilisierung der Färbung riecht sehr unangenehm - wird übrigens auch als Vergällungsmittel für technischen, zollfreien Alkohol verwendet!).
- c) Auf einem Lichtpult werden die einzelnen gefärbten Aminosäuren nach der obigen Abbildung identifiziert und **mit Bleistift** umkreist (Bleistift wird später nicht miteluiert). An einer besonderen Stelle wird auch der Papier-Blindwert (Papier-BW) markiert. Die Abkürzung der AS und des Papier-Blindwerts in die Umkreisung eintragen, sonst vergißt man leicht, welchen AS-Spot man gerade ausgeschnitten hat (**s. f**).
- d) Jede 4er-Gruppe bearbeitet nun ihr Chromatogramm nach folgender Vorschrift, wobei das Ninhydrin-getränkte Papier nur an Stellen ohne BW- oder Aminosäure-Flecken angefaßt wird:
- e) Sechs mit **Asp**, **Gly**, **Ala**, **Val**, **Leu** und **BW** beschriftete Reagensgläser vorbereiten.
- f) Auf einer sauberen Unterlage (Filterpapier) die umkreisten Flecken ausschneiden, ihr Gewicht (in mg) feststellen (hierzu bitte eine Pinzette verwenden) und die Gewichte in der Auswertetabelle (**s. D Auswertung**) notieren.
- g) In Anbetracht des dicken Chromatogramm-Papiers nun die ausgeschnittenen Flecken in **dünne Streifchen (ca. 2x20mm!)** zerschneiden, wobei ebenfalls eine Pinzette zu verwenden ist. Die Streifen am besten in einer geknickten Karteikarte sammeln und vorsichtig in entsprechend beschriftete Reagensgläser überführen.

- h) Die Elution der AS-spezifischen Färbung mit 50%igem Äthanol sollte, begleitet durch öfteres, vorsichtiges Kippen der mit Parafilm verschlossenen Reagenzgläser, solange durchgeführt werden, bis die Papierstreifen nicht mehr gefärbt sind (ca. 60-90 Min), aber bitte nicht schütteln, da dadurch Papierfasern abgelöst werden können, wodurch die Äthanolphase getrübt werden kann und bei der Fotometrie Probleme bestünden.
- i) Die Extinktions-Messung der Farbintensität im Äthanol-Extrakt erfolgt im Fotometer bei 578 nm **gegen 50%-igen Äthanol als Blindlösung**.

D) Auswertung

- a) Zur Ermittlung der Untergrundfärbung des Chromatogramms pro Massen- (=“Flächen-“) Einheit wird zunächst die Extinktion des Papier-Blindwertes (gegen 50%igen Äthanol) auf seine Fläche (=Gewicht, in mg) umgerechnet; es ergibt sich der Korrekturwert **K** nach folgender Formel:

$$\underline{\mathbf{K}} = \frac{\text{Extinktion Papier-Blindwert (gegen 50\% Äthanol)}}{\text{Gewicht Papier-Blindwert (in mg!)}}$$

- b) Der folgende Rechengang ist nun für jede einzelne Aminosäure eines Chromatogramms getrennt durchzuführen:

$$\underline{\mathbf{P\text{-Wert}}} \quad \underline{\mathbf{P = (Gewicht AS\text{-Fleck, in mg) \cdot K}}$$

(Ermittlung der Papier-Untergrundfärbung unter dem AS-Fleck)

$$\underline{\mathbf{X\text{-Wert}}} \quad \underline{\mathbf{X = (Extinktion AS\text{-Spot}) - P}}$$

(Ermittlung der von der Untergrundfärbung des Chromatogramms bereinigten Extinktion des AS-Flecks)

Y-Wert $Y = (X \cdot b) + a$ (Vorzeichen von a berücksichtigen!)

(Einsetzen der konzentrationsspezifischen Extinktion eines AS-Flecks in die durch Eichchromatogramme erstellte Regressionsgleichung (s. **Tabelle 8.1!**))

Vol.-Faktor VF = $\frac{\text{Volumen der Probe}}{\text{Volumen der Auftragsmenge}}$;

(in unserem Fall: $VF = \frac{2000 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}} = \underline{\underline{100}}$!!)

$\mu\text{g AS} / \text{Probe} = Y \cdot VF$

($\mu\text{g AS}$ in der gesamten AS-Fraktion der Probe)

Tabelle 8.1: Regressionsgleichungen für die einzelnen Aminosäuren

$Y\text{-Wert (AS-Konzentration, in } \mu\text{g/Chromatogramm)} = (b \cdot X\text{-Wert}) + a$
(Vorzeichen von a berücksichtigen!)

Aminosäure		b	a
Asparaginsäure	Asp	198.22	+ 4.5388
Glycin	Gly	56.265	- 0.4292
Alanin	Ala	52.156	+ 0.9323
Valin	Val	67.421	+ 4.0606
Leucin	Leu	136.635	- 0.8913

- c) Die Auswertung zur Aminosäure-Konzentration kann nach dem folgenden Vordruck nach der beschriebenen Methode vorgenommen und die Ergebnisse eingetragen werden.

Konz.-Stufe: A, B, C oder D (bitte ankreuzen)
(nicht vergessen, sonst kann keine Bewertung der Ergebnisse erfolgen !!)

$$K = \frac{\text{Extinktion Papier-Blindwert (gegen 50\% Äthanol!)}}{\text{Gewicht Papier-Blindwert (in mg)}}$$

$$K = \frac{\text{.....}}{\text{.....}} \quad (\text{Ext./mg})$$

.....

K = (mit 6 Nachkommastellen)

Konzentrationsberechnung für jede Aminosäure:

AS Gew.(mg)	Ext.	P	X	Y	VF	µg / Probe
Asp	100
Gly	100
Ala	100
Val	100
Leu	100

D1) Beispiel zur Auswertung:

Gegeben: Ext. Papier-Blindw.= 0.017
 Gewicht Papier-Blindw. = 120 mg

 Ext. Asparaginsäure =0.120
 Gewicht ASP= 157 mg

a) Der K-Wert ergibt sich somit aus $0.017 / 120 = \mathbf{0.000142 \text{ (Ext./mg)}}$, d.h. pro mg Gewicht des Papiers beträgt der Wert für die Untergrund-Färbung 0.000142 Extinktions-Einheiten.

b) Mit dem K-Wert wird nun berechnet, welcher Anteil der Extinktion des Asparaginsäure-Flecks auf die Untergrund-Färbung entfällt:

$$\mathbf{P = \text{Gewicht(AS)} \cdot K; P = 157 \cdot 0.000142; P = 0.022 \text{ (Ext/mg} \cdot \text{mg)}}.$$

c) Dieser Anteil der Untergrund-Färbung des Papiers wird als nächstes von der Extinktion der Aminosäure abgezogen:

$$\mathbf{X = 0.120 - P\text{-Wert; } X = 0.120 - 0.022; \underline{X\text{-Wert} = 0.098.}}$$

d) Die somit von der Untergrund-Färbung bereinigte Extinktion der Aminosäure wird mit den Koeffizienten der für die entsprechende Aminosäure berechnete lineare Regressionsgleichung verrechnet, woraus sich deren Konzentration ergibt:

$$\underline{\mathbf{Y = (X \cdot b) + a;}}$$

Für Asparaginsäure ergibt sich somit:

$$\mathbf{Y = (0.098 \cdot 198.22 + 4.5388;}$$

$$\mathbf{Y = 19.426 + 4.5388;}$$

$$\underline{\mathbf{Y = 23.964 \text{ (}\mu\text{g Asparaginsäure/20 } \mu\text{l Probe auf dem Chromatogramm)}}.$$

e) Da die Probe ein Gesamtvolumen von 2ml (=2000 μ l) umfaßte, wir aber nur 20 μ l davon auf das Chromatogramm aufgetragen hatten, ergibt sich ein Vol.-Faktor von $\mathbf{2000/20 = 100}$.

Wir erhalten also:

$$\underline{\mathbf{\mu\text{g Asparaginsäure/Probe} = 23.964 \cdot 100 = 2396.4.}}$$

E) Literatur:

Karlson, P., D. Doenecke u. J. Kolman (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
G. Thieme-Verlag, Stuttgart

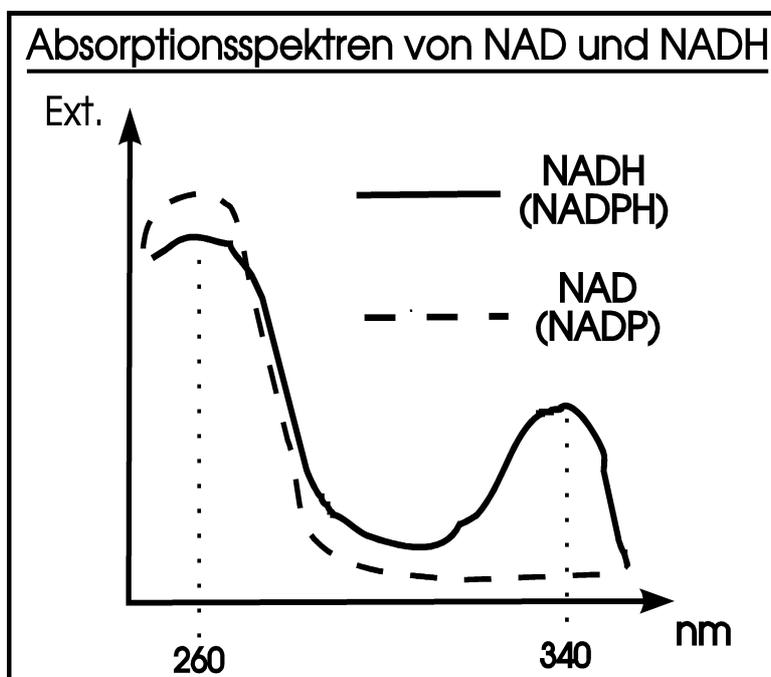
4. Arbeitstag

Quantitative Bestimmung der Saccharose- und D-Glucose-Gehalte der Zuckerfraktion (von Versuch 1, 1. Arbeitstag) mittels Enzym-Testsatz.

Versuchsziel: Einführung in die enzymatische Analytik zur Bestimmung von Metaboliten.

A) Prinzip (s. Einführung)

Verschiedene Reagentienhersteller haben sogenannte "Enzym-Testsätze" zur quantitativen Bestimmung wichtiger Metaboliten in ihrem Programm, wobei die Enzyme quasi als Reagentien eingesetzt werden.



Sehr oft handelt es sich hierbei um gekoppelte Enzym-Reaktionen mit Dehydrogenasen als End-Reaktionen, die entweder NAD oder NADP zu NADH + H⁺ bzw. NADPH + H⁺ umsetzen. Diese beiden Coenzyme weisen ein unterschiedliches Absorptionsspektrum auf (s. nebenstehendes Schema), anhand dessen die eigentliche Metaboliten-Bestimmung fotometrisch ermöglicht wird (z.B. Messung von NADH oder NADPH bei 340 nm).

B) Material und Geräte

- a) Probe: eingengte Zucker-Fraktion von **Versuch 1, 1.AT**;
- b) Enzym-Testsatz (Boehringer, Mannheim), bestehend aus folgenden Lösungen:
 - β-Fruktosidase-Lösung (Nr. 3);
 - Puffer, NADP, ATP (Nr. 1);
 - Hexokinase- u. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Lösung (Nr. 2)
- c) Fotometer bei 340 nm;
- d) Eppendorf-Pipetten;
- e) Küvetten-Rührstäbchen.

C) Durchführung (4 Studenten)

- a) Jede 4er-Gruppe hat hierfür vom 1. Arb.-Tag zwei Zucker-Proben zur Verfügung. Davon wird eine Probe ausgewählt und deren **Konzentrationsstufe sofort im Heft vermerkt.**
- b) Die inzwischen zur Trockne eingedampfte Zucker-Fraktion wird zunächst quantitativ mit je 10 ml A. dest. aufgenommen, wobei die innere Glaswand des Becherglases intensiv mittels Gummiwischer abzureiben ist.
- c) Jede Gruppe (8 Studenten) führt nun die beiden Analysen (s.o.), zusammen mit dem Gruppenbetreuer, nach dem unten angegebenen Arbeitsschema an einem LKB-Digitalphotometer bei 340 nm (Molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon=6.3$) durch:

<u>Ansatz-Vorschrift</u> (Boehringer, Mannheim)			
<u>Reagenz-Einsatz:</u>	<u>1</u>	<u>K ü v e t t e</u>	
	Blindwert	<u>2</u>	<u>3</u>
		Saccharose (Ges.-Glucose)	Glucose
<u>Probe:</u>	-----	0.1ml	0.1ml
<u>β-Fructosidase:</u>	0.2ml	0.2ml	----
(Testsatz-Lösg. 3)			
I. Saccharose	β -Fructosidase + H ₂ O ----->Glucose + Fructose mischen, 15 Min. bei 25°C		
<u>Puffer + NADP + ATP</u> (Testsatz-Lösg. 1)	1.0ml	1.0ml	1.0ml

<u>Reagenz-Einsatz:</u>	<u>K ü v e t t e</u>		
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
	Blindwert	Saccharose (Ges.-Glucose)	Glucose
<i>A.dest. ad 3.0ml</i>	1.8ml	1.7ml	1.9ml
<u>mischen, nach 3 Min. Ablesen der Extinktionen:</u>			
	<u>E11</u>	<u>E21</u>	<u>E31</u>

<i>Hexokinase + Glucose-6P-Dehydrogenase (HK bzw. G6P-DH) (Testsatz-Lösg. 2)</i>	0.02ml	0.02ml	0.02ml
<p style="text-align: center;">HK II. Glucose + ATP -----> Glucose-6P + ADP</p> <p style="text-align: center;">G6P-DH III. Glucose-6P + <u>NADP</u> -----> Gluconat-6P + <u>NADPH</u> + H⁺ (s. Spektren von <u>NADP</u> und <u>NADPH</u>, s.S. 85)</p>			
<u>nach ca. 10-15 Min. Ablesen der Extinktionen:</u>			
	<u>E12</u>	<u>E22</u>	<u>E32</u>

D) Auswertung

<u>Berechnungen:</u>	Blindwert	Saccharose (Ges.-Glucose)	Glucose
<u>Berechnung von ΔE:</u>	$\Delta E1 = E12 - E11$	$\Delta E2 = E22 - E21$	$\Delta E3 = E32 - E31$
	$\Delta E1 = \dots\dots\dots$	$\Delta E2 = \dots\dots\dots$	$\Delta E3 = \dots\dots\dots$
<u>Berechnung von:</u>			
ΔE (Glucose)	= $\Delta E3 - \Delta E1$		
ΔE (Glucose)	= $\dots\dots\dots$		
ΔE (Saccharose) = $(\Delta E2 - \Delta E1) - \Delta E$ (Glucose)			
ΔE (Saccharose)	= $\dots\dots\dots$		
<u>Einsetzen von ΔE (Glucose) und ΔE (Saccharose) in die Formeln nach der Testsatz-Vorschrift:</u>			
$\underline{\text{Glucose (g/l)}} = 5.441 \cdot \frac{\Delta E \text{ (Glucose)}}{\epsilon}$			
$\underline{\text{Glucose (g/l)}} = \dots\dots\dots$			
$\underline{\text{Saccharose (g/l)}} = 10.34 \cdot \frac{\Delta E \text{ (Saccharose)}}{\epsilon}$			
$\underline{\text{Saccharose (g/l)}} = \dots\dots\dots$			
Der ϵ-Wert für die Meßwellenlänge von 340 nm beträgt 6.3			

Zum Schluß noch berücksichtigen, daß zur Aufnahme der eingedampften Zucker-Fraktion 10 ml A. dest. verwendet wurden, das Proben-Volumen demnach also 10 ml beträgt:

Glucose (mg/10 ml Probe) =

Saccharose (mg/10 ml Probe) =

Die Konzentrationsstufe der Probe war: A B C D
(bitte ankreuzen!)

**Grundlagen der Elektrophorese und deren Anwendungsmöglichkeiten zur
Trennung von Proteinen - Einführung zu den Versuchen 10 und 11:**

Versuch 10: Elektrophorese eines Präparates der Sauren Phosphatase unter „nativen“ Bedingungen mit anschließender Protein- und Enzymspezifischer Anfärbung der Elektropherogramme

Versuch 11: SDS-Elektrophorese des Präparates der Sauren Phosphatase unter denaturierenden Bedingungen zur Bestimmung des Molekulargewichtes anhand von Referenz-Proteinen

Elektrophorese bedeutet "Wanderung geladener Substanzen im elektrischen Feld", wobei sich Kationen zur Kathode (-Pol) und Anionen zur Anode (+Pol) bewegen. Dieses Verfahren wird als biochemische Standardmethode z.B. in der analytischen und präparativen Proteinchemie, zur DNA-Sequenzierung und Trennung von DNA-Bruchstücken eingesetzt (s. S. 186).

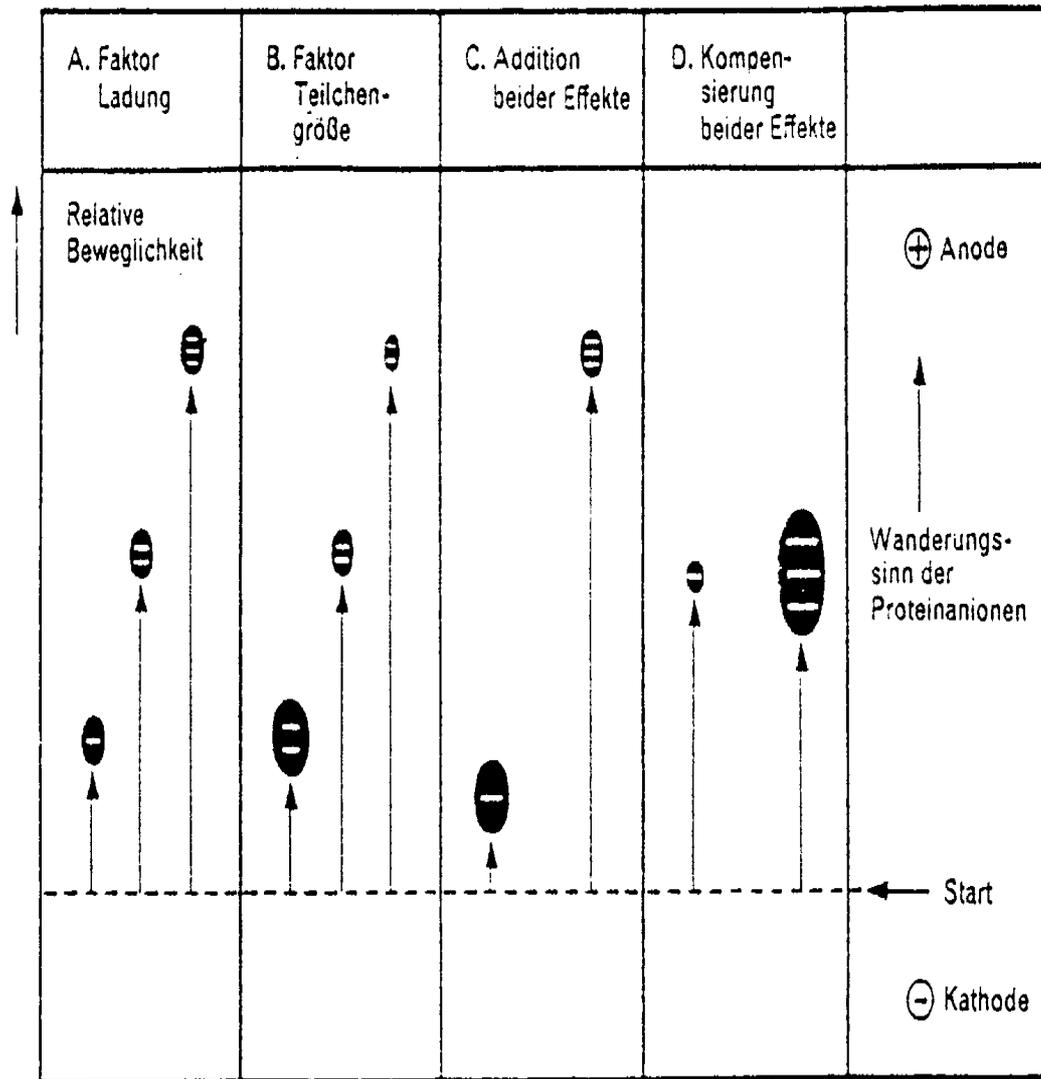
Für die Beweglichkeit eines geladenen Moleküls im elektrischen Feld ist eine Reihe von Faktoren bestimmend. Zunächst einmal ist die treibende Kraft (**F**), die auf ein Molekül einwirkt, direkt proportional der Gesamtladung (**Q**) dieses Moleküls und der Stärke des elektrischen Feldes (**E/d**):

$$F = \frac{E}{d} \cdot Q; \quad \text{wobei } \frac{E}{d} = \text{Feldstärke } \left(\frac{V}{cm} \right);$$

Weiterhin wird sich ein Molekül im elektrischen Feld um so langsamer bewegen können, je größer seine Reibung mit dem umgebenden Medium ist. Dabei ist die Reibung umso größer, je größer das wandernde Molekül und je viskoser das Medium ist (STOKE'sches Gesetz). Auch die Form des Moleküls spielt hierbei eine wichtige Rolle (s.w.u.).

Der Einfluß von Ladung und Größe auf die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinmolekülen bei als konstant angenommener Feldstärke ist schematisch aus **Abbildung 10.1** ersichtlich.

Als Medium oder Träger zur Durchführung der Elektrophorese gibt es viele Materialien, die je nach Anwendungsfall spezifische Vorteile bieten. Neben Papier, Stärke- und Agargelen und verschiedenen Folien (z.B. Polyacetat) wird in der Biochemie heute vor allem Polyacrylamid-Gel (PAG; PAGE = PAG-Elektrophorese) verwendet. Es ist völlig ungefärbt und inert, d.h. die Elektrophorese ist ohne chemische Veränderungen der zu trennenden Moleküle durchführbar. PAG ist aus Acrylamid (giftig!) unter Einsatz von quervernetzenden Faktoren (vor allem N,N'-Methylen-bis-Acrylamid) im Labor selbst herstellbar (**s. Abb. 10.2**).

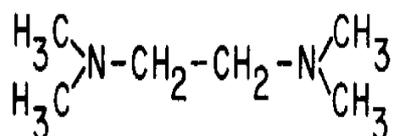
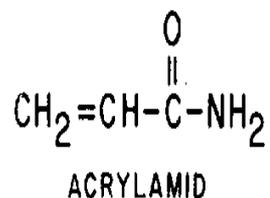


Einfluß von Ladung und Teilchengröße auf die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Überschlußladungen eingezeichnet.

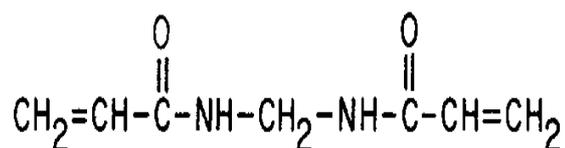
Abb. 10.1 (aus: AEBI, H.: Einführung in die praktische Biochemie:
Akad.-Verl.-Ges. FFM, 1965)

Viele Firmen liefern auch Fertiggele für die verschiedensten Anwendungen. Dabei bestimmen die Anteile von Acrylamid und bis-Acrylamid im Gelansatz die Auspolymerisierung des Gels mit definierten Porenbereichen (s. Abb. 10.3).

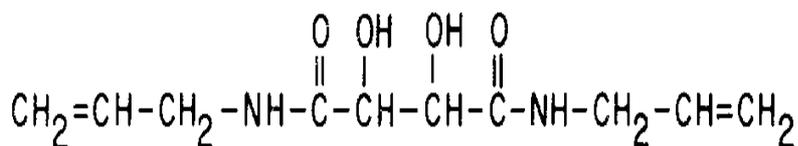
Neben den oben besprochenen Einflußfaktoren auf die elektrophoretische Beweglichkeit geladener Moleküle spielt die Porosität des PAG eine entscheidende Rolle. Dies wird in Abbildung 10.4 für verschiedene Referenz-Proteine (= "Marker") gezeigt.

Abb. 10.2 (aus: Cooper, 1981)

TETRAMETHYLENDIAMIN (TEMED)

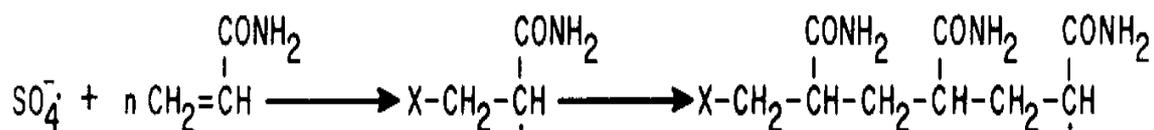


N,N'-METHYLEN-bis(ACRYLAMID)



N,N'-DIALLYLTARTARDIAMID

Verbindungen zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen.



Polymerisation des Acrylamids.

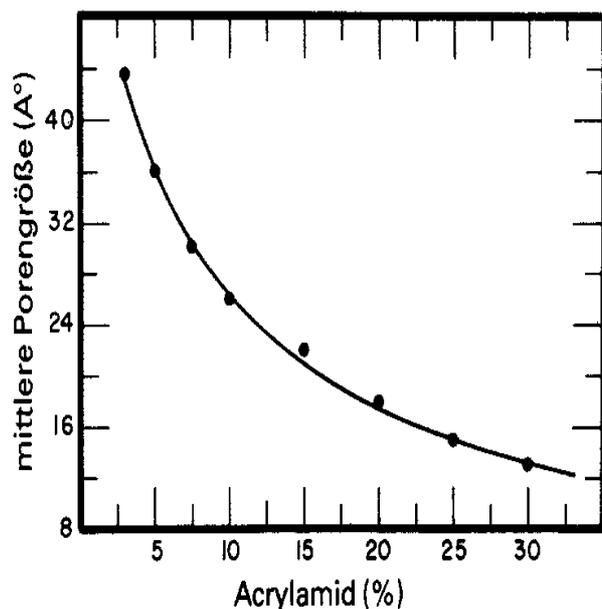
Abb. 10.2, Fortsetzung (aus: Cooper, 1981)

Einfluß der Bisacrylamid-Konzentration im Gel auf die mittlere Porengröße.

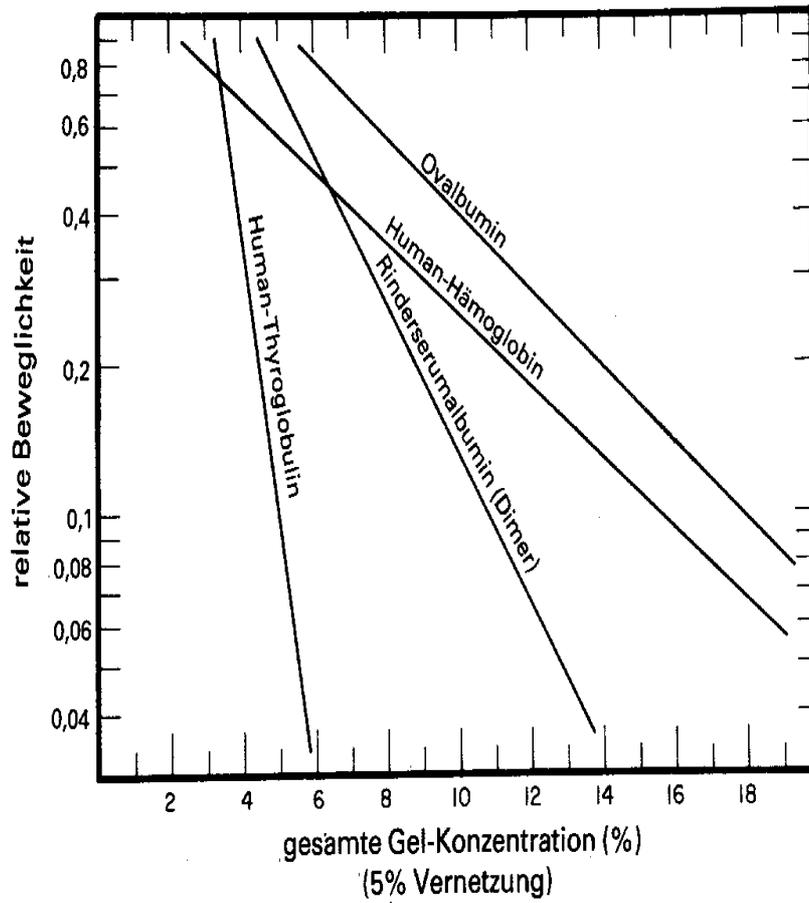
Gesamt-Acrylamid-Konzentration (%)	Porengröße (Å) ^a			
	1%	5%	15%	25% ^b
6,5	24	19	28	—
8,0	23	16	24	36
10,0	19	14	20	30
12,0	17	9	—	—
15,0	14	7	—	—

^a Bestimmt anhand von Molekülen, für die 50% des Gelvolumens zugänglich ist.

^b N,N-Methylen-bisacrylamid.

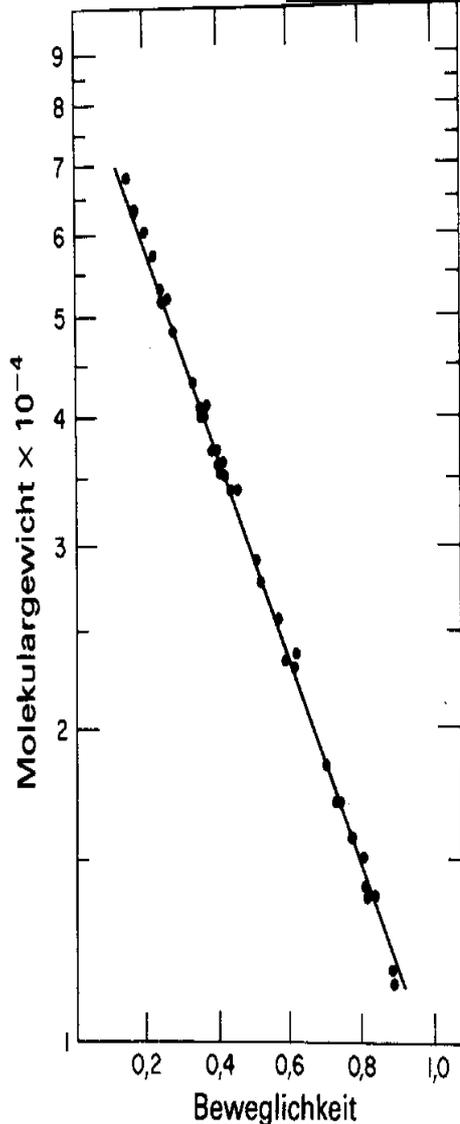
Abb. 10.3, (aus: Cooper, 1981)

Einfluß der Gel-Konzentration (Prozent Gewicht/gesamtes Gelvolumen) auf die mittlere Porengröße.

Abb. 10.4a, (aus: Cooper, 1981)

Abhängigkeit der elektrophoretischen Beweglichkeit von der Gel-Konzentration für verschiedene Proteine.

Abb. 10.4b, (aus: Cooper, 1981)



Abhängigkeit des Molekulargewichts von 37 verschiedenen Proteinen zwischen 11000 und 70000 d und ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit.

Für die praktische Arbeit bedeutet dies, die Porengröße des PAG für die jeweilige Trennaufgabe spezifisch zu wählen. Trennt man z.B. hochmolekulare Proteine in einem PAG mit zu engen Poren, wird man auch bei hoher Feldstärke feststellen müssen, daß die Eiweiße nicht in das PAG eindringen können und demzufolge nicht zu trennen sind. Will man andererseits hochmolekulare Proteine in einem PAG mit zu großen Poren trennen, so werden die Faktoren Molekülladung und Viskosität des Mediums allein vermutlich für eine gute Trennung nicht ausreichen.

Zur Trennung von Proben mit kleinen und großen Molekülen bietet sich die Anwendung von sogenanntem Gradienten-PAG an, d.h. im unteren Teil dieser Gele ist die

Acrylamid-Konzentration hoch, während sie nach oben, zur Probenauftragsseite hin, kontinuierlich abnimmt. Dadurch ergeben sich von unten nach oben Poren mit zunehmender Größe. Der Vorteil dieser Gradientengele ist, daß große Moleküle oben gut in das Gel eindringen und wandern können, während kleine Moleküle im unteren Gelbereich durch zunehmend engere Poren daran gehindert werden, aus dem Gel herauszuwandern, bevor noch die Großmoleküle ausreichend gut getrennt sind.

Die PAGE kann entweder in Rundgelen, die in kleinen Glasröhrchen hergestellt wurden, oder in Flachgelen zwischen rechteckigen Glaskassetten durchgeführt werden. Der Vorteil von Flachgelen ist die Trennung von Parallelproben im gleichzeitigen Vergleich mit Referenz-Proben innerhalb eines Elektropherogramms.

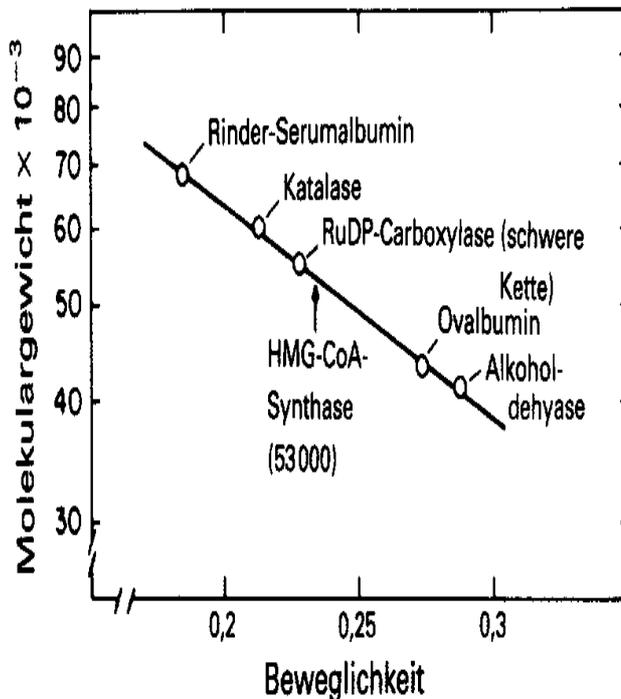
Bei der Durchführung der PAGE zur Trennung von Proteingemischen spielt auch das zu verwendende Puffersystem eine entscheidende Rolle. Zum einen gewährleistet es während der Elektrophorese einen konstanten pH-Wert im Gel und im Elektrodenpuffer, zum anderen stellt es Elektrolyten zur Stromleitung zwischen den Elektroden zum Gel und innerhalb des Gels zur Verfügung. Das Trennergebnis wird ebenfalls vom verwendeten Puffer beeinflusst: Proteine mit einem isoelektrischen Punkt (IEP) über dem Puffer-pH liegen als Kationen vor, Proteine mit einem IEP unter dem Puffer-pH als Anionen.

Bei anderen Elektrophorese-Verfahren mit horizontalem Trägermaterial, wie z.B. Stärke- oder Agar-Gelen, mit der Möglichkeit, Proteinproben in der Gelmitte aufzutragen, sind sowohl als Kationen als auch als Anionen vorliegende Proteine trennbar. Bei der Vertikal-Acrylamidgel-Elektrophorese mit Probenauftragung an der oberen Gelseite sind aber nur Proteine entweder als Kationen oder als Anionen zu trennen. Die angelegte Elektroden-Polarität entscheidet somit über die Trennung von Kationen oder von Anionen. In Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffersystems erhält man folglich völlig unterschiedliche Trennergebnisse. Im übrigen können Proteine mit einem IP, der dem pH-Wert des Puffers entspricht, während der Elektrophorese nicht wandern, da sie keine Netto-Ladung aufweisen. Sie bleiben auch bei hoher Feldstärke am Auftragspunkt liegen.

Neben der Größe (s.o.) ist auch die Form von Molekülen für ihre elektrophoretische Beweglichkeit ausschlaggebend, bei Proteinen also deren Tertiär-, und Quartär-Struktur. Für die Bestimmung des Molekulargewichts von Eiweißmolekülen gibt es die Möglichkeit, höhere Struktur- und Aggregierungsformen durch Detergentien (z.B. SDS = Natrium-Dodecyl-Sulfat) zu zerstören, wodurch nun nur die Größe der Primärstruktur der Proteine (=Molekulargewicht) für ihre Trennung entscheidend wird. Hierzu werden die Proteinproben mit SDS-haltigem Puffer (=Proben-Puffer) vorbehandelt und auf SDS-haltigen Gelen mit SDS-Elektrodenpuffer der Elektrophorese unterzogen. Durch Vergleich mit SDS-vorbehandelten Referenz-Proteinen bekannten Molekulargewichts ist besonders gut mit einer Flachgel-

Elektrophorese (s.o.) das Molekulargewicht unbekannter Proben-Proteine bestimmbar (s.Abb. 10.5).

Abb. 10.5 (aus: Cooper, 1981)



Bestimmung des Molekulargewichts der Untereinheit der HMG-CoA-Synthase aus Mitochondrien durch SDS-Gelelektrophorese.

Die SDS-Behandlung von Proteinen bewirkt folgendes:

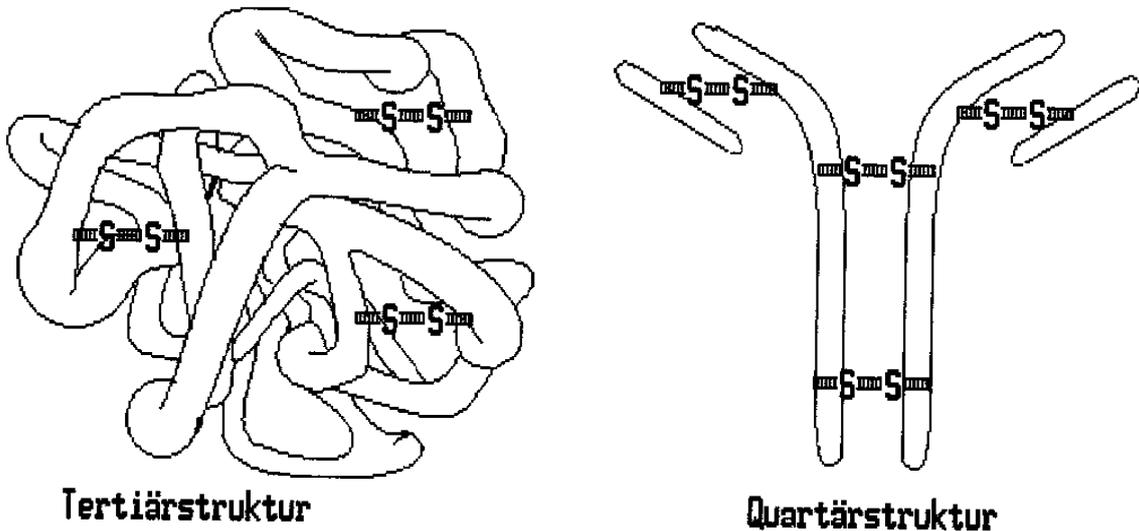
- 1.) Überdeckung individueller Ladungsunterschiede einzelner Proteine durch das anionische Detergenz;
- 2.) Spaltung von Wasserstoff-Brückenbindungen;
- 3.) Verhinderung von Aggregationen einzelner Proteine;
- 4.) Streckung von Polypeptidketten und Bildung ellipsoider Strukturen

Die letztlich ellipsoid geformten Proteinketten nehmen masse-spezifische Mengen an SDS auf und erhalten dadurch eine negative Nettoladung, die proportional ist dem Molekulargewicht der behandelten Proteine. Die nach SDS-Behandlung resultierende

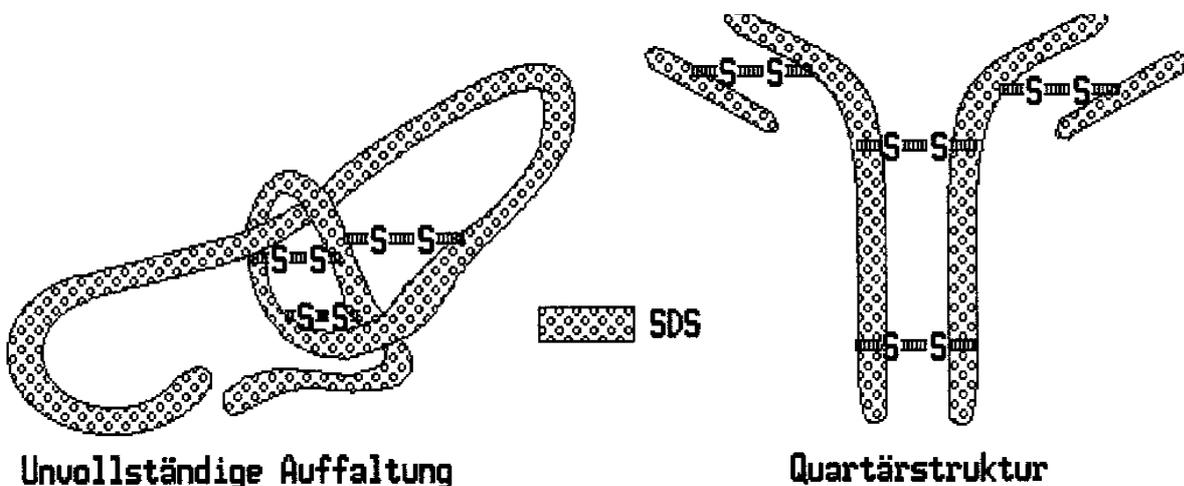
elektrophoretische Beweglichkeit ist somit ein Maß für das Molekulargewicht der Proteine.

Der Einfluß von SDS auf höhere Protein-Strukturformen ist jedoch nur auf die Spaltung von Wasserstoff-Brückenbindungen beschränkt. Höhere Struktur- und Aggregat-Zustände von Proteinen, welche auf Disulfid-Brücken ($R-SH + HS-R \rightarrow R-S = S-R$) beruhen, werden durch SDS nicht entfaltet. Erst durch SDS-Behandlung in Kombination mit reduzierenden Bedingungen durch Dithiothreitol (DTT) oder 2-Mercaptoethanol (Geruch!) erreicht man eine vollständige Streckung auch solcher Proteinstrukturen zu ellipsoiden Polypeptid-Ketten (s.Abb. 10.6).

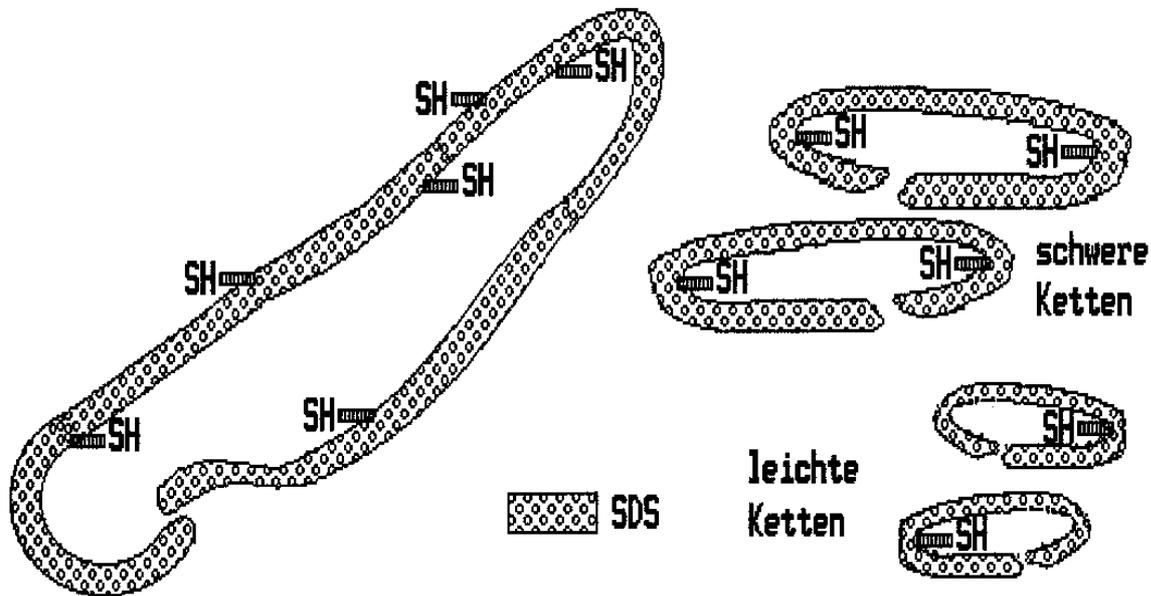
Abb. 10. 6 (aus: Westermeier, 1990)



Nativzustand von Proteinen.



SDS-behandelte Proteine ohne Reduzierung.

Abb. 10. 6, Fortsetzung (aus: Westermeier, 1990)

SDS-behandelte und reduzierte Proteine.

Mittels geeigneter Farbstoffe (z.B. Bromphenolblau) ist der zeitliche Verlauf der Elektrophorese kontrollierbar. Diese geladenen kleinmolekularen Farbstoffe wandern im elektrischen Feld zusammen mit der Pufferfront vor den zu trennenden Makromolekülen. Die Elektrophorese wird abgebrochen, wenn die Farbstoff-Bande das untere Gelende erreicht hat. Damit wird sichergestellt, daß während der Elektrophorese keine Proteine aus dem Gel auswandern.

Nach der Elektrophorese sind substanzspezifische Färbeverfahren einzusetzen, um ungefärbte Moleküle im Elektropherogramm sichtbar zu machen. Nach der Trocknung angefärbter Elektropherogramme sind qualitative (z.B. Autoradiographie) oder quantitative Auswerteverfahren, z.B. mittels Densitometer oder Radioaktivitäts-Scanner, und die Dokumentation der Ergebnisse, z.B. durch Fotografie, durchführbar.

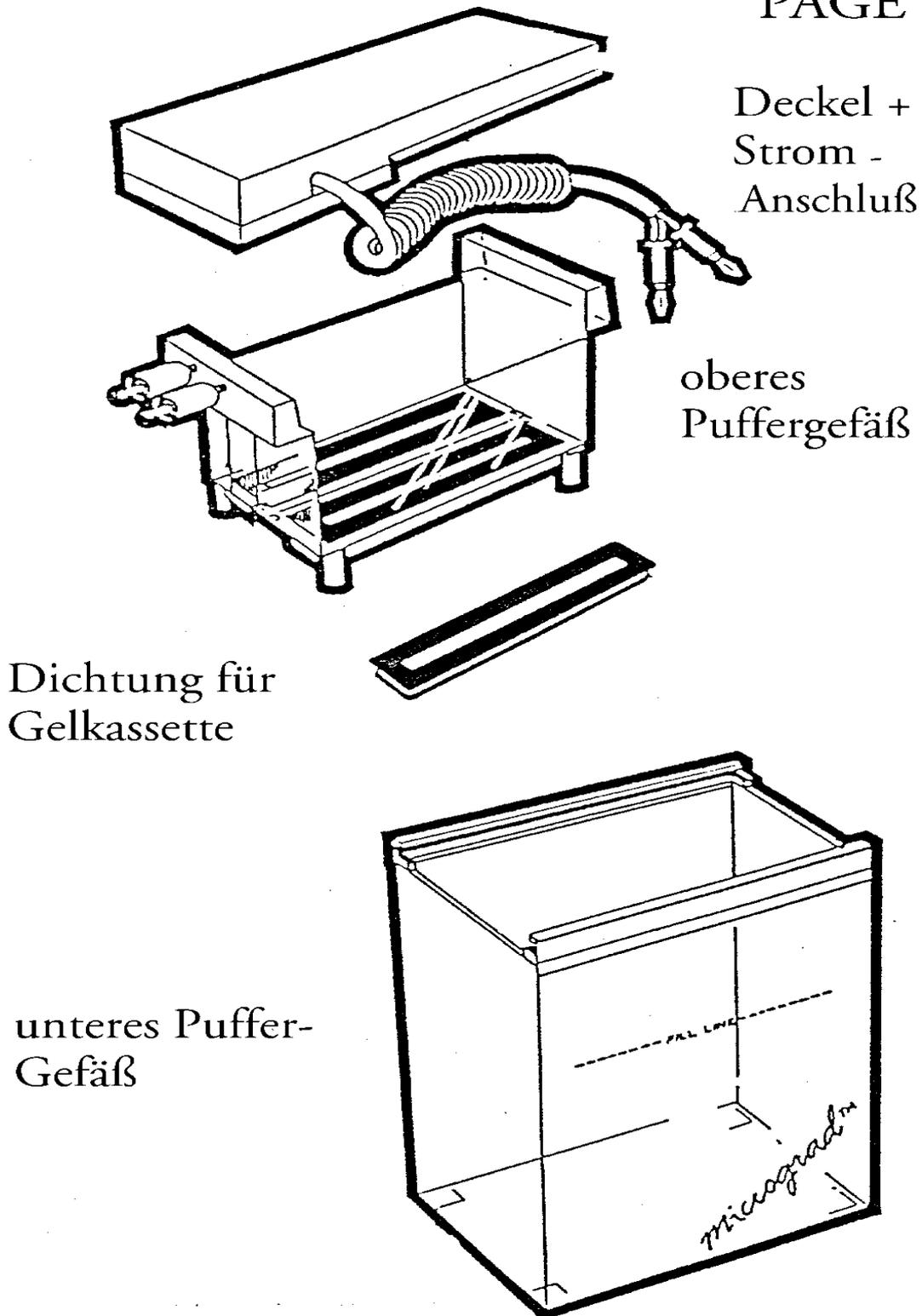
Apparative Voraussetzungen der Elektrophorese

Die Ausrüstung zur Durchführung der Elektrophorese (PAGE) besteht aus einer Elektrophorese-Apparatur (s. Abb. 10.7) und einem geeigneten Netzgerät.

Die Elektrophorese-Kammer besteht aus einem unteren und oberem Puffer-Trog, in den das Flachgel innerhalb zweier Glasplatten dicht eingesetzt wird. Im oberen und unteren Puffergefäß befinden sich Platindraht-Elektroden, die über einen Deckel berührungssicher mit der Spannungsversorgung verbunden werden.

Abb. 10. 7 (aus: Gerätebeschreibung der Firma Micrograd)

Elektrophoresegerät zur PAGE



Literatur

- AEBI, H. (1965): Einführung in die praktische Biochemie.
Akad. Verl.-Ges. FFM
- BERTRAM, S. u. H.G. GASSEN (1991): Gentechnische Methoden.
G. Fischer, Stuttgart
- BURCK, H.-C. (1966): Histologische Technik.
G. Thieme, Stuttgart
- COOPER, T.G. (1981): Biochemische Arbeitsmethoden
W. de Gruyter, Berlin, New York
- MAURER, H.R. (1968): Disk-Elektrophorese.
W. de Gruyter, Berlin
- STRYER, L. (1994): Biochemie.
Spektrum Akad. Verlag
- WESTERMEIER, R. (1990): Elektrophorese-Praktikum.
VCH, Weinheim
- VOET, D. u. J.G. VOET (1992): Biochemie.
VCH, Weinheim

4. Arbeitstag

Elektrophorese eines Präparates der Sauren Phosphatase unter „nativen“ Bedingungen mit anschließender Protein- und Enzym-spezifischer Anfärbung der Elektropherogramme.

Versuchsziel: Prüfung eines Präparates der Sauren Phosphatase auf Verunreinigungen durch andere Proteine der Kartoffel – Einführung in die Elektrophorese.

A) Prinzip s. Einführung**A1) Versuchsfrage:**

Bei den enzymkinetischen Untersuchungen (s. Versuch 7) kam ein Präparat der Sauren Phosphatase aus Kartoffeln (Firma BOEHRINGER) zur Anwendung. Dieses Präparat soll in diesem Versuch auf seine Reinheit überprüft werden, indem es zunächst unter nativen Bedingungen, d.h. ohne Denaturierung und Reduzierung (s. Einführung), elektrophoretisch getrennt wird. Dabei ist zu untersuchen, welche Protein-Banden auf eventuelle Verunreinigungen durch andere Proteine der Kartoffel und welche auf die Saure Phosphatase selbst zurückzuführen sind. Dabei soll gezeigt werden, daß Enzymproteine nach dieser Art der Elektrophorese noch aktiv sind und ihre funktionale Enzymstruktur erhalten bleibt. Durch das Verfahren ist entsprechend der jeweiligen Substrat-..polymerisation ein bestimmtes Protein am Elektropherogramms zu lokalisieren.

Der Versuch gliedert sich in folgende Arbeitsschritte:

- 1.) PAG-Elektrophorese im Flachgel von 8 Parallelproben der Sauren Phosphatase.
- 2.) Trennung des Elektropherogramms in zwei Hälften mit jeweils 4 Parallelspuren.
- 3.) Die getrennten Proteine werden in einer Gelhälfte wie üblich fixiert und mit Coomassie-Brilliantblue G-250 angefärbt.
- 4.) Die andere Gelhälfte wird ohne Fixierung der getrennten Proteine nach Einstellung eines optimalen pH-Werts in Substrat- und Färbelösung für Saure Phosphatase inkubiert.
- 5.) In Gelbereichen mit Saurer Phosphatase-Aktivität entstehen rote Banden, da das aus dem Substrat enzymatisch freigesetzte Produkt an einen Azofarbstoff gekoppelt wird (s. S. 107).

B) Material

- 1) Elektrophorese-Apparatur und Netzteil;
- 2) TEB-Puffer (Tris-EDTA-Borat-Konzentrat):
für Proben-Ansatz und Elektrophorese 10-fach verdünnen.
- 3) Probe der Sauren Phosphatase:
10 mg Saure Phosphatase, 1 g Saccharose, 0.25 mg Bromphenolblau in 1ml TEB-Puffer (B-2) lösen.
- 4) Eppendorf-Varipipette (1-10µl) + weiße Spitzen;
- 5) Polyacrylamid-Fertiggel: HILINX, Acrylamid-Gradient 5-50%

Zur Protein-Färbung (A):

- 6) Färbelösung ("Gradipure")
- 7) 10%-ige Trichloressigsäure
- 8) 7%-ige Essigsäure
- 9) passende Petrischale ("A")

Zur Enzym-Färbung (B):

- 10) Citrat-Puffer, 0.1M, pH 5.6:
10.5 g Citronensäure x 1 H₂O in 100 ml A. dest. lösen,
100 ml 1N NaOH zugeben und mit A. dest. auf 500 ml auffüllen;
davon 69 ml mit 31 ml 0.1N NaOH mischen (pro Gel 50 ml).
- 11) Substrat-Lösung:
20 mg Na-(1)-Naphthylphosphat und 20 mg Fast Red TR mit 50 ml Citrat-Puffer (B-10) auf Magnetrührer ca. 30 Minuten rühren und über das Gel durch Faltenfilter filtrieren (Lösung stets frisch ansetzen!) (50 ml pro Gel).
- 12) Fixierlösung:
70% Äthanol, 5% Eisessig, 25% A. dest. (50 ml pro Gel);
- 13) passende Petrischale ("B");

Anmerkungen zur Anfärbung der Elektropherogramme

Protein-Färbung:

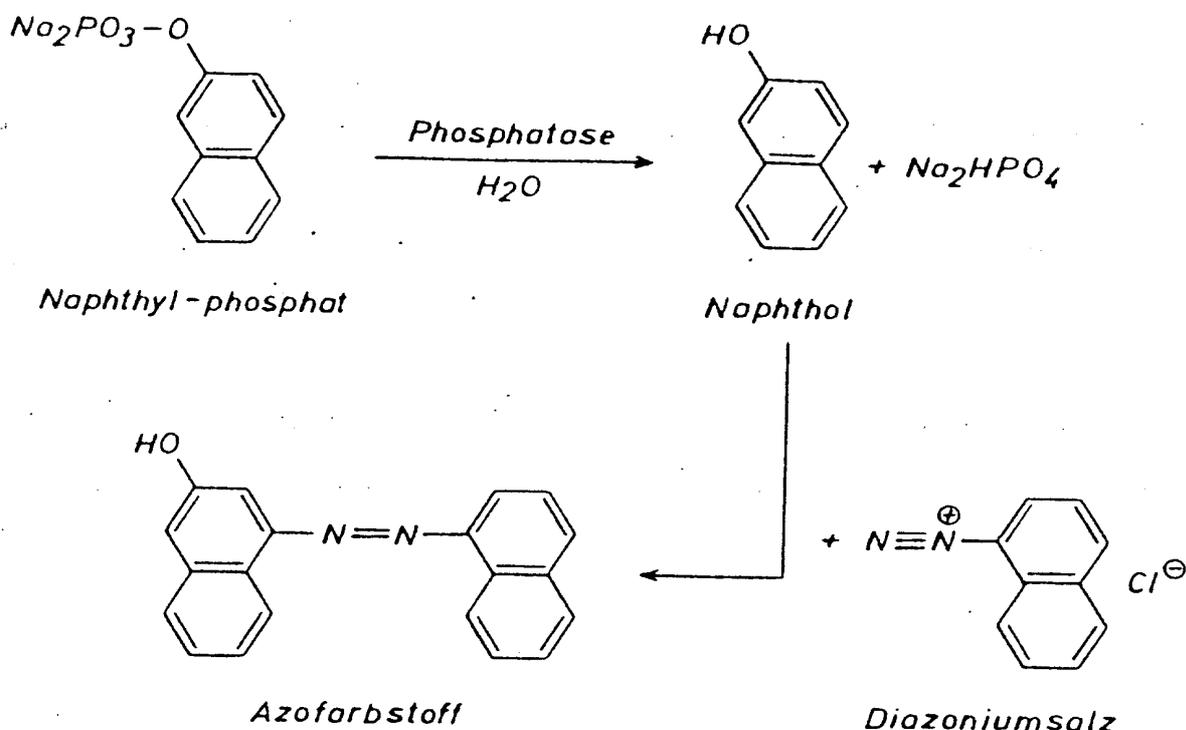
"Gradipure" enthält Coomassie-Brilliantblue G-250, einen Farbstoff, der sich an Proteine anlagert und in 7%iger Essigsäure eine stabile Färbung ergibt (blau). Mit diesem Farbstoff sind Proteinmengen bis zu 1-2 ng noch nachweisbar.

Enzym-Färbung:

Im allgemeinen gilt, daß Enzym-spezifische Farbreaktionen in ihrer Nachweis-Empfindlichkeit den Protein-spezifischen Färbemethoden weit überlegen sind.

Das Prinzip Enzym-spezifischer Färbungen von Elektropherogrammen ist der Histologie entlehnt und besteht darin, daß ein leicht in das Polyacrylamidgel diffundierendes Substrat nach der enzymatischen Umsetzung an einen Farbstoff gebunden wird, der nicht aus dem Gel diffundieren kann oder unlöslich ist.

Nach BURK (1966) und MAURER (1968) wird im Falle der Sauren Phosphatase Na-(1)-Naphthylphosphat als Substrat verwendet. Nach der enzymatisch katalysierten Abspaltung von Phosphat entsteht Naphthol, das mit Diazonium-Chlorid (Fast RED TR) zu einem Azofarbstoff nach folgendem Reaktionsschema umgesetzt wird:



C) Durchführung

C1) Geräte-Vorbereitung und Elektrophorese

- a) Die Gelkassetten mit Klammer versehen, Lufteinschlüsse zwischen Gel und Glasplatten eventuell unter A. dest. durch vorsichtiges Drücken auspressen und einen Plastik-Probenkamm mit 12 Probentaschen an der Glaskassetten-seite mit Gelaussparung leicht in das Gel eindrücken. Mit einem Filzschreiber das rechte Klebeband markieren, welches der Probentasche 12 zugewandt ist (wichtig für die spätere Markierung des Elektropherogramms).
- b) Die Gummidichtung des oberen Puffertrogs mit Silikonpaste leicht einfetten und die Gelkassette vorsichtig einschieben. Danach die Andruck-Vorrichtung an der Unterseite des Puffertrogs arretieren. Das Gel soll während der Elektrophorese die einzige Verbindung zwischen oberem und unterem Puffergefäß bilden, so daß auf Dichtheit der Anordnung zu achten ist.
- c) Den unteren Puffertrog mit ca. 700 ml TEB-Puffer (B-2) befüllen.
- d) Den oberen Pufferbehälter mit Gel in das untere Pufferreservoir einsetzen und die Puffer-Einfüllhöhe im unteren Tank einjustieren. Der Puffer-Spiegel sollte ca. 1cm über dem unteren Rand der oberen Pufferkammer stehen.
- e) Nun auch den oberen Puffertrog zunächst mit wenig TEB-Puffer (B-2) füllen, so daß der Probenkamm im Gel ca. 1 cm überstaut ist. Mittels Pasteur-Pipette und Gummiball sind eventuell verbliebene Luftblasen im Probenkamm (von oben in das Gel schauen!) durch einen kräftigen Pufferstrom zu entfernen.
- f) Die Probe der Sauren Phosphatase (B-3) mittels Eppendorf-Varipipette vorsichtig applizieren. Dabei für jede Probe eine neue Pipetten-Spitze verwenden. Die Saccharose-Zugabe zum Ansatz der Lösung verhindert hierbei die Vermischung der Probe mit dem Puffer. Bei der Proben-Beschickung nach folgendem **Schema** (s.S. 109) verfahren:

1. und 12. Probentasche: jeweils frei lassen

**2., 3., 4. und 5. Probentasche,
8., 9., 10. und 11. Probentasche:**

jeweils 2, 4, 7 und 10 µl S. Phosphatase-Probe

(die 6. u. 7. Probenflasche bleiben frei zur späteren Teilung des Elektropherogramms für die beiden Färbeverfahren)

Bitte vermerken, welche Probenflasche mit welchem Proben Volumen jeweils zu befüllen ist!

- g) Den Deckel auf die Apparatur aufschieben und die beiden Anschlußkabel farblich mit dem Netzgerät verbinden.
- h) Für 2 Minuten 200 V anlegen, bis die blaue Bromphenolblau-Zone in das Gel eingewandert ist. Dabei ist die Stromstärke des Netzgerätes zu überprüfen. Ergibt sich dabei keine oder eine zu große Stromstärke (**Normalwert ca. 20-50mA**), so ist das ein Hinweis darauf, daß beim Geräte-Zusammenbau oder der Gel- und Probenbeschickung Fehler gemacht wurden. In diesem Fall die Elektrophorese stoppen und, wenn noch ein Fertiggel vorhanden ist, die vorhergehenden Schritte wiederholen, wobei nun besonders darauf zu achten ist, daß weder Pufferbrücken in der Gelkassette noch Luftblasen in den Probenflaschen den normalen Ablauf der Elektrophorese behindern.
Scheint alles normal zu laufen, dann nach etwa 2 Minuten, wenn die Bromphenolblau-Zone in das Gel eingewandert ist, das Netzgerät abschalten, den Deckel entfernen und vorsichtig mit einer Pinzette den Plastik-Probenkamm aus dem Gel ziehen. Dies ergibt eine gleichmäßigere und höhere Feldstärke im Gel.
- i) Den Deckel wieder aufsetzen, das Netzgerät einschalten und bei 200 V solange die Elektrophorese fortführen, bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht hat. Auch hierbei sollte die Stromstärke ab und zu überprüft werden.
- j) Danach die Spannung am Netzgerät abschalten und das Gel aus der Apparatur nehmen. Dabei die Gelkante, an der die Proben aufgebracht wurden, nach oben halten, wobei die Markierung am Klebestreifen nach rechts weisen sollte. An der rechten Seite der Glaskassette den markierten Klebestreifen entfernen und die obere Glasplatte aufklappen.
- k) Mit einem Spatel das auf der unteren Glasplatte aufliegende Gel in der Mitte durchstechen. Auf jeder Gelhälfte befinden sich somit 4 Proteinspuren mit unterschiedlicher Protein-Konzentration. Wir erhalten damit 2 identische Elektropherogramme (linke Hälfte = A; rechte Hälfte = B).
- l-B) Nun zunächst an der rechten oberen Ecke der rechten Gelhälfte (B) mit dem Spatel ein kleines Gel-Eck zur Markierung abstechen und dieses Gel mit einer

Spritzflasche (A. dest.) vorsichtig in eine mit "B" markierte Petrischale (B-13) überspülen (zur Enzym-spezifischen Färbung).

- l-A) In gleicher Weise mit Gelhälfte "A" verfahren und das Gel in die mit A markierte Petrischale zur Protein-spezifischen Anfärbung überführen.
- m-B) Die zur Enzym-spezifischen Färbung vorgesehene Gelhälfte B sofort mit 50 ml Citrat-Puffer (B-10) überschichten und für 10 Minuten auf Eis oder in Kühlschrank stellen. Dadurch erreicht man eine Umstimmung des pH-Werts von 8.3 während der Elektrophorese auf den für die Saure Phosphatase optimalen pH von 5.6 (s. Versuch 7, s.S. 57).
- m-A) Die andere Gelhälfte (A) wird zur Protein-spezifischen Anfärbung zunächst für 10 Minuten mit 10%iger Trichloressigsäure (B-7) behandelt. Dabei erfolgt eine Ausfällung, Denaturierung und Fixierung der getrennten Proteine im Elektropherogramm.

C2) Weiterer Gang der Enzym-spezifischen Färbung des Gels:

- n1) Nach erfolgter Einstellung des pH-Werts wird der Citrat-Puffer vorsichtig vom Gel abgegossen. Die Inkubation der Gelhälfte B in 50 ml Substratlösung (B-11) erfolgt während 5 Minuten bei Zimmertemperatur. Nach kurzer Zeit ist eine rote Bande im Gel sichtbar, die sich infolge Diffusion relativ schnell verbreitert.
- n2) Nach Abgießen der Substrat-Lösung wird das Gel mit 50 ml Fixier-Lösung (B-12) bei 30°C während 15 Minuten fixiert. Dabei kommt es meist zu einem Schrumpfen des Gels, welches jedoch bei der anschließenden Lagerung in 7%iger Essigsäure (B-8) reversibel ist.

C3) Weiterer Gang der Protein-spezifischen Färbung des Gels:

- o1) Nach der Fixierung der Proteine im Gel durch TCA* erfolgt ihre Anfärbung mit wenig "GRADIPURE" (B-6) für etwa 20 Minuten. Zur Färbung auch schwacher Banden kann dieser Schritt auch auf 24 Stunden ausgedehnt werden.
- o2) Die gefärbten Elektropherogramme werden in 7%-iger Essigsäure (B-8) aufbewahrt, wodurch die Farbintensität der Banden noch zunimmt.

D) Auswertung

Am zweckmäßigsten geht man bei der Auswertung, ohne Möglichkeit zur Quantifizierung durch ein Densitometer oder Bildanalysesystem, folgendermaßen vor:

1) Nach erfolgter Anfärbung der Protein-Banden der beiden Gelhälften überträgt man

a) entweder auf einer Lichtplatte die Positionen der Proteinbanden zusammen mit dem oberen und unteren Gelrand (=Bromphenolblau-markierte Pufferfront) auf ein neben der Petrischale liegendes Papier. Dabei ist die Intensität der Gelbanden nach folgendem Schema zu kodieren:

* TCA=Trichloressigsäure

—— = starke Intensität;
 ----- = mittlere Intensität;
 = schwache Intensität;

b) oder man kopiert das Gel in einer Petrischale mit 7%iger Essigsäure mittels Fotokopiergerät in einem vergrößerten Maßstab.

2) Die elektrophoretische Beweglichkeit einzelner Proteinbanden wird nun relativ zur Pufferfront (=Gel-Ende) mit dem R_f -Wert (s. **Versuche 4 und 5**) charakterisiert, wobei man die nach 1a) oder 1b) auf Papier übertragenen Strecken benutzt:

z.B. Strecke Gel-Anfang bis Gel-Ende = a
 Strecke Gel-Anfang bis Bande = b

$$\underline{R_f = b / a}$$

Somit erhalten einzelne Banden-Positionen einen zur Pufferfront relativen Wert, der zwischen 0 und 1 liegt.

3) Durch die Errechnung von R_f -Werten für die nach beiden Verfahren gefärbten Elektropherogramme sollte es möglich sein, Banden mit Phosphatase-Aktivität den Protein-spezifisch gefärbten Banden zuzuordnen und zu entscheiden, welche Proteinbanden auf Verunreinigungen des Präparates der Sauren Phosphatase zurückzuführen sind.

Anmerkung:

Mittlerweile gibt es sehr leistungsfähige Meßgeräte, Densitometer oder Bildauswertesysteme, zur quantitativen Auswertung von z.B. Elektropherogrammen und Dünnschicht-Chromatogrammen, sowohl im Hinblick auf die Ermittlung der

relativen Beweglichkeit als auch auf die Bestimmung der relativen Farbintensität getrennter Substanzen.

Ergebnis der Berechnung von R_f -Werten für die Protein-Banden des nach zwei Verfahren angefärbten Elektropherogramms:							
a) Protein-Färbung			b) S. Phosphatase-Färbung				
	b	a	R_f		b	a	R_f
1.			1.		
2.			2.		
3.			3.		
4.			4.		
5.			5.		
6.			6.		
7.			7.		

Bitte Protein-Banden markieren, die im Hinblick auf ihren R_f -Wert in a) und b) übereinstimmen und demnach vermutlich identisch sind!

5. Arbeitstag:

SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese eines Präparates der Sauren Phosphatase unter reduzierenden (denaturierenden) Bedingungen zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinfraktionen anhand von Molekulargewichts-Standards.

Versuchsziel: Anwendung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese für besondere Trennaufgaben, z.B. zur MG-Bestimmung.

A) Prinzip (s. Einführung zur Elektrophorese)**A1) Versuchsfrage:**

Während in **Versuch 10** ein Präparat der Sauren Phosphatase unter nativen Bedingungen elektrophoretisch getrennt und ein Enzym-Nachweis nach der Elektrophorese durchgeführt wurde, arbeiten wir in diesem Versuch gezielt unter Bedingungen zur Denaturierung der Proteinstruktur zur zusätzlichen Bestimmung des Molekulargewichtes der Sauren Phosphatase. Hierzu wird das Präparat der Sauren Phosphatase mit SDS behandelt (Spaltung von Wasserstoff-Brücken) in Kombination mit reduzierenden Substanzen zur Spaltung von Disulfid-Bindungen (s. Einführung zur Elektrophorese).

In Anbetracht der im **Versuch 10** nachgewiesenen Verunreinigungen im Präparat der Sauren Phosphatase durch andere Proteine der Kartoffelknolle treten neben den Banden der Sauren Phosphatase noch weitere Proteinfraktionen in Erscheinung, wodurch nicht entschieden werden kann, welche Bande(n) der Sauren Phosphatase zuzuordnen ist (sind). Eine Enzym-spezifische Färbung der Elektropherogramme scheidet hier aus, da unter den gewählten Bedingungen die Saure Phosphatase denaturiert ist und keine Enzymfunktion mehr aufweist.

B) Material

- 1) Elektrophorese-Apparatur und Netzteil;
- 2) SDS-vorbehandelte Proben der Sauren Phosphatase ("SP");
- 3) SDS-vorbehandelte Referenz-Proteine definierten Molekulargewichtes ("MP");
- 4) Tris-Tricin-SDS-Puffer-Konzentrat, pH 7.5; vor Gebrauch 20-fach verdünnen (50ml/l);
- 5) Eppendorf-Varipipette (1-10 μ l) + weiße Spitzen;
- 6) Polyacrylamid-Fertiggel: SDS-620, 6-20 % Acrylamid-Gradient;
- 7) Färbelösung ("Gradipure");
- 8) 10%-ige Trichloressigsäure;
- 9) 7%-ige Essigsäure.

C) Durchführung**C1) SDS-Vorbehandlung der Phosphatase-Probe und der Referenz-Proteine**

Zunächst aus 300 mg SDS, 1g Saccharose, 0.25mg Bromphenolblau, 50mg Dithiothreitol (DTT) und 20-fach verdünntem TTS-Puffer (4) ad 10 ml den Proben-Puffer herstellen.

Die Protein-Proben und die Referenz-Protein-Probe getrennt in Proben-Puffer lösen (100µl/mg Protein) und bei 100°C 5 Minuten kochen. Die Lysate gegebenenfalls in der Zentrifuge klären.

(wird vom Betreuer vorbereitet !)

Beim Aufkochen der Proben im Proben-Puffer kann ein Teil des als Reduktionsmittel zugesetzten DTT verbraucht werden, so daß eine weitere Zugabe von DTT nach Kochen und Abkühlen der Probe erforderlich sein kann.

Auf diese Weise vorbehandelte Proteinproben können auch tiefgefroren gelagert werden. Nach dem Auftauen ist jedoch erneut aufzukochen und gegebenenfalls DTT zuzusetzen.

C2.) Geräte-Vorbereitung und Elektrophorese (s. Versuch 10!)

- a) Das SDS-PAG in Glaskassetten mit Klammer versehen, auf Lufteinschlüsse achten und einen Plastik-Probenkamm mit 12 Probenaschen leicht in das Gel eindrücken.
- b) Die Gelkassette in die Silikongummi-Dichtung des oberen Puffertrogs vorsichtig einschieben, die leicht mit Silikonpaste eingefettet wird. Das Gel soll die einzige Verbindung zwischen oberem und unterem Puffergefäß bilden.
- c) Den unteren Puffertrog mit ca. 700ml TTS-Puffer (4) befüllen.
- d) Den oberen Pufferbehälter mit Gel in das untere Pufferreservoir einsetzen und die Puffer-Einfüllhöhe unten einjustieren.
- e) Auch den oberen Puffertrog zunächst mit wenig TTS-Puffer füllen. Mittels Pasteur-Pipette und Gummiball sind eventuell verbliebene Luftblasen im Probenkamm (von oben in das Gel schauen!) durch einen kräftigen Pufferstrom zu entfernen.
- f) Die Protein-Proben und Marker-Proteine mittels Eppendorf-Varipipette vorsichtig applizieren (dabei für jede Probe eine neue Pipetten-Spitze verwenden!). Die

Saccharose-Zugabe zum Proben-Puffer verhindert hierbei die Vermischung der Proben mit dem Elektroden-Puffer. Bei der Proben-Beschickung nach folgendem Schema verfahren, wobei man sich notiert, welche Probe wo aufgetragen werden soll:

<u>1. u. 2. und 11. u. 12. Probenflasche:</u> jeweils frei lassen
<u>3. u. 4. und 9. u. 10. Probenflasche:</u> 2, 3, 4 und 5 μl Referenz-Protein-Probe
<u>5., 6., 7., 8. Probenflasche:</u> 1, 2, 3 und 5 μl s. Phosphatase-Probe

- g) Nach vollständiger Füllung des oberen Puffertrogs mit Elektroden-Puffer den Deckel auf die Apparatur aufschieben und die beiden Anschlußkabel farbrichtig mit dem Netzgerät verbinden.
- h) Für ca. 2 Minuten 200 V anlegen, bis die blaue Bromphenolblau-Zone mit den Proteinproben in das Gel eingewandert ist (**Stromstärke prüfen, s.o.!**) und danach vorsichtig den Probenkamm mit einer Pinzette aus dem Gel ziehen. Dies ergibt eine gleichmäßigere Feldstärke im Gel.
- i) Nun bei 200 V solange die Elektrophorese durchführen, bis die Bromphenolblau-Bande (=Pufferfront) den unteren Gel-Rand erreicht hat.
- j) Die Spannung am Netzgerät abschalten und das Gel aus der Apparatur nehmen. Dabei die Gelkante, an der die Proben aufgebracht wurden, nach oben halten. An einer Seite der Glaskassette den Klebstreifen entfernen und die obere Glasplatte aufklappen. Das Gel ist völlig klar und, gegen das Licht gesehen, erkennt man eventuell bereits Protein-Banden).
- k) Mit einem Messer die rechte obere Ecke des Gels zur Orientierung abtrennen und das Gel vorsichtig in eine passende Petrischale gleiten lassen. Zunächst zur Fixierung (=Denaturierung) der Protein-Banden 10%-ige Trichloressigsäure (B-8) während 10 Minuten einwirken lassen. Darauf folgt die Anfärbung der Proteine durch Coomassie Brilliant Blue G-250 ("Gradipure") (B-7) während 20 Minuten.

- 1) Die gefärbten Elektropherogramme werden in 7%-iger Essigsäure (9) aufbewahrt, wodurch die Farbintensität der Banden noch zunimmt.

D) Auswertung

Tabelle des Molekulargewichts der verwendeten Referenz-Proteine

Protein	Molekular-Gewicht (kd)	isoelekt. Punkt (pI)
1.) Kohlensäureanhydratase	29	4.2
2.) Ei-Albumin	45	5.9
3.) Rinderserum-Albumin	67	4.9
4.) Phosphorylase B	92	5.2
kd = Kilodalton	pI = pH des isoelektrischen Punktes	

Anhand der in obiger Tabelle angegebenen Molekulargewichte der Referenz-Proteine ist das Molekulargewicht der sauren Phosphatase-Bande(n) größenordnungsmäßig einzuordnen. Durch Zerstörung höherer Organisationsformen der Proteine nach SDS-Behandlung kann man dabei davon ausgehen, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine hauptsächlich von deren Kettenlänge abhängt. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller als größere, sie sind demnach also weiter unten im Gel zu lokalisieren.

Am zweckmäßigsten geht man bei der Auswertung, ohne Möglichkeit einer Quantifizierung durch ein Densitometer oder Bildanalyseverfahren, folgendermaßen vor:

- 1) Nach Anfärbung der Protein-Banden überführt man das Elektropherogramm mit etwas 7%-iger Essigsäure in eine passende Petrischale. Nach dem Markieren des Gruppennamens wird eine vergrößernde Fotokopie des Gels hergestellt. Dabei sollte die markierte Gel-Ecke nach rechts oben weisen.
- 2) Anhand einer Fotokopie des Elektropherogramms kann die Einordnung des Molekulargewichts der Proteine im Präparat der Sauren Phosphatase anhand der Referenz-Proteine relativ leicht erfolgen (s. Ergebnis-Tabelle, s.S. 117):

Ergebnis der Berechnung von R_f -Werten (s.S. 111) für die Protein-Banden der Sauren Phosphatase im Vergleich mit den Banden der Referenz-Proteine

a) Saure Phosphatase			b) Referenz-Proteine		
	b	a R_f		b	a R_f
1.		1.	
2.		2.	
3.		3.	
4.		4.	
5.		5.	
6.		6.	
7.		7.	

Bitte Protein-Banden markieren, die im Hinblick auf ihren R_f -Wert in a) und b) übereinstimmen und demnach hinsichtlich ihres Molekulargewichts vermutlich identisch oder ähnlich sein könnten!

5. Arbeitstag:

ELISA-Test zur quantitativen Bestimmung der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (=Rubisco)-Konzentration in Blättern (Methode: U. GROSS).

Versuchsziel: Einführung in immunologische Arbeitsverfahren.

A) Prinzip allgemein

Die ELISA-Technik ermöglicht bei einem vorhandenen Mikrotiterplatten-Reader eine quantitative Erfassung geringster Mengen an Antikörpern bzw. Antigenen. Dabei wird ein Antigen- oder Antikörper-Molekül an ein Enzymsystem gekoppelt, welches eine Farbreaktion eingehen und so zur quantitativen Bestimmung des Antigens oder des Antikörpers führen kann.

Erforderliche Antikörper (AK) werden über das Immunsystem von Tieren gebildet. In der Herstellung unterscheidet man mono- und polyclonale Antikörper. Monoclonale AK werden in Zellkulturen hergestellt, wobei eine Fusion von differenzierten B-Lymphocyten mit Myelomazellen (B-Tumorzellen) stattfindet. Üblicherweise stammen beide Zell-Linien von Mäusen. Diese Zellen produzieren absolut identische Antikörper. Im Gegensatz dazu werden polyclonale Antikörper in Ratten oder Kaninchen nach dem Prinzip der Immunabwehr-Immunantwort gebildet. Diese Antikörper sind nicht 100%-ig identisch, weshalb es häufiger zu „Kreuz-Reaktionen“ kommen kann. Dies bedeutet, daß sich auch chemisch unterschiedliche Substanzen am selben Antikörper binden können.

Bei einem ELISA-Test unterscheidet man zwischen direkten, indirekten und kompetitiven Verfahren. Beim direkten ELISA-Test wird die zu bestimmende Substanz direkt an der Menge der bindenden Antikörper bestimmt. Dagegen erfolgt beim indirekten ELISA-Test der Nachweis über markierte zusätzliche Antikörper. Beim kompetitiven ELISA-Verfahren konkurrieren schließlich sekundäre Antikörper und zu bestimmende Substanz um dieselben Bindungsstellen am primären Antikörper.

A1) Prinzip der Konzentrationsbestimmung von Rubisco-Protein

Zur Bestimmung der Menge an Rubisco-Protein wird ein Verfahren beschrieben, das Herr Dr. Groß im Rahmen seiner Doktorarbeit (s. Literatur) verwendet hat:

Das in Carbonat/Bicarbonat-Puffer (pH 9.6) gelöste Antigen (hier: Rubisco-Standardpräparat oder gereinigte Rubisco aus Blattextrakten) wird nach einem bestimmten Schema (s.S. 121) in die „wells“ einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die beschickte Platte wird 18 Stunden bei 4°C im Dunklen inkubiert.

Pipettierschema für ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	LW	0,010µg/ml	0,05µg/ml	0,25µg/ml	1,0µg/ml							
C	LW	0,010µg/ml	0,05µg/ml	0,25µg/ml	1,0µg/ml							
D	LW	0,010µg/ml	0,05µg/ml	0,25µg/ml	1,0µg/ml							
E		0,025µg/ml	0,10µg/ml	0,50µg/ml								
F		0,025µg/ml	0,10µg/ml	0,50µg/ml								
G		0,025µg/ml	0,10µg/ml	0,50µg/ml								
H												

LW: Leerwert

Nach mehrmaligem Nachwaschen der Platte mit Waschpuffer erfolgt das Blockieren freier Bindungsstellen auf der inneren well-Oberfläche der Titerplatte mit einer 5%igen Lösung von Rinderserum-Albumin. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt abermals ein Waschprozeß.

Nun erfolgt die Bindung des als 1. AK verwendeten Anti-Rubisco-Antiserums an das Antigen in den wells der Titerplatte während einer 1.5 Stunden dauernden Inkubation bei 25°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre, wonach nicht gebundener 1. AK abermals dreimal mit Waschpuffer auszuwaschen ist.

Während diese Vorarbeiten in Anbetracht zu kurzer Zeit am Praktikumsnachmittag noch im Institut durchgeführt werden, werden die folgenden Arbeitsschritte im Praktikum ausgeführt (Nachweis-Reaktion):

- a) Bindung des 2. AK (Ziegen-Anti-Kaninchen-AK, gekoppelt an Alkalische Phosphatase⁺⁾), Verdünnung 1:1000;
- e) 1 Std. Inkubation bei 25°C und Auswaschen von nicht gebundenem 2. AK durch 3x Waschen mit Waschpuffer;
- f) Start der Enzym-Substrat-Reaktion des gekoppelten Enzyms durch Substratzugabe (Substrat = p-Nitro-phenylphosphat);
- g) Abwarten der Farbreaktion (20-40 Min.) und Beenden durch NaOH-Zusatz.

B) Material

- a) Rubisco-Standardpräparat;
- b) Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9.6:
jeweils frisch ansetzen:
1.59g Na₂CO₃
2.93g NaHCO₃
A. dest. ad 1 l
- c) Waschpuffer I (Tris-HCl, pH 7.2):
12.11g Tris
8.75g NaCl
A. dest. ad 1 l
- d) BSA-Lösung:
5.00g bovine serum albumine
Waschpuffer I ad 100 ml
- e) Kaninchen-Anti-Rubisco-Antiserum;
- f) Waschpuffer II (Tris-HCl, pH 7.2):
50 µl Tween 20
BSA-Lösung (d) ad 100 ml

⁺⁾ siehe Versuche mit Saurer Phosphatase (3. Arbeitstag, s.S. 57)

- g) Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, Sigma Product-No. A-8025;
- h) Waschpuffer III (Tris-HCl, pH 7.2):
 - 50 µl Tween 20
 - Waschpuffer I ad 100 ml
- i) Substrat-Lösung für Alkalische Phosphatase:
 - 100 mg p-Nitrophenylphosphat
 - Carbonat-Bicarbonat-Puffer (b) ad 100 ml
- j) NaOH (2n).

C) Durchführung

C1) Vorbereitung der Mikrotiterplatten im Institut

- a) Das zu untersuchende Rubisco-Präparat (**B,a**) wird zunächst in Carbonat-Bicarbonat-Puffer (**B,b**) gelöst. Jeweils 200 µl werden nach dem beiliegenden Pipettiermuster (s.S. 121) in die wells der Mikrotiterplatte pipettiert.
- b) Die beschickte Titerplatte wird nun 18 Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert.
- c) Danach erfolgt ein 3-maliges Waschen des an die Plastikwandung der wells adsorbierten Rubisco-Proteins mit je 250 µl Waschpuffer I (**B,c**), wobei die Platte zwischenzeitlich zur Entfernung der vorherigen Waschflüssigkeit aus den wells kräftig auszuklopfen ist.
- d) Die an der Wandung der wells durch die zugegebenen Antikörper noch nicht abgesättigten Bindungsstellen werden mit je 250 µl BSA-Lösung (**B,d**) blockiert (Inkubation der Platte 1 Stunde bei 25°C).
- e) Dreimaliges Waschen der wells mit jeweils 250 µl Waschpuffer I (**B,c**) für je 10 Minuten und Platte ausklopfen.
- f) Zur Bindung des ersten Antikörpers (**B,e**, 1:1000 verdünnt in Waschpuffer II (**B,f**)) an die sorbierten Antigen-Bindungsstellen (=Rubisco-Protein) werden je 200 µl des verdünnten ersten Antikörper-Ansatzes in die wells pipettiert und die Platte 1.5 Stunden bei 25°C in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert.
- g) Dreimaliges Waschen der wells mit jeweils 250 µl Waschpuffer II (**B,f**) für je 10 Minuten und Platte zwischendurch ausklopfen.

C2) Arbeiten im Rahmen des Praktikums:

- h) Nun erfolgt die Bindung des 2. Antikörpers: Ziege-Anti-Kaninchen-AK (**B,g**), 1:1000 mit Waschpuffer II (**B,f**) verdünnt, wird in einer Menge von jeweils 200 µl in jede Vertiefung (well) der Platte pipettiert. Die Platte wird für 1 Stunde bei 25°C inkubiert.

-
- i) Dreimaliges Waschen der wells mit jeweils 250 µl Waschpuffer III (**B,h**) für je 10 Minuten und Platte zwischendurch ausklopfen.
 - j) Nun wird der Test auf Alkalische Phosphatase durchgeführt: 200 µl der Substratlösung (**B,i**) wird pro well einpipettiert. Nach 20-40 Minuten sollte eine umso deutlichere Gelbfärbung in den wells der Platte entstanden sein, je mehr zweite Antikörper, gekoppelt an Alkalische Phosphatase, an erste Antikörper gebunden worden sind, die ihrerseits vorher in größerer Menge mit Rubisco-Protein eine Immunreaktion eingegangen waren.
 - j) Die Farbreaktion der Alkalischen Phosphatase wird durch Zugabe von NaOH (**B,j**) gestoppt.

D) Auswertung

Da für das Praktikum kein Mikrotiterplatten-Reader oder -Photometer zur Verfügung steht, kann die Auswertung nur visuell qualitativ vorgenommen werden. Entsprechend den Konzentrationsangaben im Pipettierschema (s.S. 121) ist zu prüfen, ob die Farbintensität mit steigender Rubisco-Proteinkonzentration zunimmt.

E) Literatur

GROSS, U. (1990): Der Einfluß von Saccharose und der CO₂-Konzentration auf die Aktivität von Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase und Phosphoenolpyruvat Carboxylase und die Konzentration der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase in autotrophen Zellkulturen von *Arachis hypogaea* L. und *Daucus carota* L.
Dissertation der Justus Liebig-Universität, Gießen.

5. Arbeitstag

Quantitative Bestimmung des Äthanolgehalts in verschiedenen Getränken mittels Gaschromatografie.

Versuchsziel: Einführung in quantitative Bestimmungsverfahren in der Gaschromatografie.

A) Prinzip (s. Einführung in die Gaschromatografie, s.S. 25)

A1) Vorbemerkung

Während im ersten Versuch zur Einführung in die Gaschromatografie niederkettige Alkohole im Hinblick auf ihr Retentionsverhalten untersucht wurden, liegt es nahe, die Gaschromatografie auch zur quantitativen Bestimmung des Äthanol-Gehaltes in verschiedenen Getränken einzusetzen.

Im Gegensatz zu einem FID (=Flammenionisations-Detektor), dem gebräuchlichsten Detektor im praktischen Einsatz der GC, ist mit dem WLD unseres Gaschromatografen auch Wasser nachzuweisen, so daß die beiden Hauptkomponenten Wasser und Äthanol in Getränken gleichzeitig bestimmt werden können.

Anwendungsmöglichkeiten für diese Methode wären z.B. die Alkohol-Bestimmung in Alkohol enthaltenden Medikamenten (Melissengeist und anderen Pflanzenauszügen) oder in Fruchtsäften, um Gärungsprozesse während deren Herstellung oder Lagerung (Verderb!) zu erfassen. Auch die Prüfung auf Abwesenheit von giftigem Methanol in verschiedenen Gärungsprodukten wäre durchführbar.

Das Prinzip der quantitativen Analyse basiert hier auf einer Integration der Peaks von Wasser und Äthanol und Ausgabe der anteiligen Flächenintegrale nach der 100%-Methode. Dabei bleiben allerdings die in der Einführung angesprochenen Korrekturfaktoren für ein eventuell unterschiedliches Ansprechverhalten des WLD auf Wasser und Äthanol unberücksichtigt.

Wie die folgenden Ergebnisse von Voruntersuchungen an definierten Äthanol-Wasser-Gemischen zeigen, ist mit diesem Verfahren eine ausreichende Genauigkeit zu erzielen:

Tabelle 1: Ergebnisse von Voruntersuchungn

Probe		% Soll:	% Messung:
abs. ETOH	H ₂ O:	?	1
	ETOH:	96	99
(als technischer Alkohol 96%ig angegeben und aus steuerlichen Gründen vergällt; Anteil Wasser und Vergällungsmittel nicht bekannt!) ¹			
1 VT abs. ETOH + 1 VT H ₂ O	H ₂ O:	50	43
	ETOH:	50	57
Anmerkung: Volumen-Kontraktion!			
1 VT abs. ETOH + 2 VT H ₂ O	H ₂ O:	67	65
	ETOH:	33	35
Anmerkung: Volumen-Kontraktion!			
Rum	H ₂ O:		53
	ETOH:		47
Zwetschgenwasser	H ₂ O:		58
	ETOH:		41

¹ Bei offener Vorratsflasche nimmt Äthanol abs. (hoch polar!) begierig Wasser aus der Luft auf. Andererseits verdampft Äthanol abs aus offener Vorratsflasche. Dadurch kann sich die aktuelle Äthanol-Konzentration in oft gebrauchten Vorratsflaschen ändern!

Anmerkung:

Bei der 100%-Methode zur Bestimmung der Anteile von Wasser und Äthanol ist zu beachten, daß insofern ein Fehler entstehen kann, als die untersuchten Produkte noch weitere Ingredientien enthalten können, die entweder gaschromatografisch nicht erfaßbar sind oder erst später bzw. bei höherer Temperatur von der GC-Säule eluiert werden. Hier steht das Prinzip im Vordergrund, nicht die absolute Genauigkeit!

B) Material und Reagentien

1) Gaschromatograf in Verbindung mit einem Computer über eine ADC-Steckkarte

Trennbedingungen:

Detektor:	WLD
Säule:	Chromosorb 102 (Eigenschaften siehe Beschreibung in Versuch 3)
Säulen-Temperatur:	120°C
Temperatur Einspritzblock:	160°C
Temperatur Detektor:	160°C
Trägergas:	Helium
Trägergas-Flußrate:	60 ml/Min.

2) 5µl-Spritze

3) Proben: verschiedene alkoholische Getränke (in kleinen Mengen!!)
(Es können auch eigene Proben mitgebracht werden)

C) Durchführung (s. hierzu auch **Durchführung zu Versuch 3!**)

- 1) Jede Gruppe entscheidet sich für eine der vorhandenen Proben und führt während ca. 45 Minuten am GC eine (oder zwei) Bestimmung(en) durch.
- 2) Von jeder Probe werden 2.5 µl in den GC eingespritzt, wenn sich eine stabile Basislinie am Bildschirm eingestellt hat.
- 3) Ist nach ca. 400 Sekunden der Äthanol-Peak eluiert, wird das Chromatogramm-Aufnahmeprogramm über <ESC> verlassen. Das gesamte Chromatogramm erscheint nun auf dem Bildschirm.

- 4) Am Display des GC einen neuen Aufheizzyklus für die nächste Analyse starten.
- 5) Über die Taste <O> oder <RETURN> gelangt man in ein Optionsmenü, das eine Bearbeitung des Chromatogramms nach verschiedenen Gesichtspunkten ermöglicht.
- 6) Vor der Integration des Wasser- und Äthanol-Peaks wird zunächst die Basislinie eingestellt und, falls die Basislinie eine Drift aufweist, diese über den Punkt "Drift" korrigiert.
- 7) Nun kann integriert werden, wobei für jeden Peak jeweils Start- und Endpunkt auf der Zeitachse zu fixieren sind. Am Ende diesen Menüpunkt über <ESC> verlassen. Das Chromatogramm zeigt nun neben jedem Peak die zugehörigen Flächenanteile in Prozent an. Wie bereits in der Anmerkung zu obiger Tabelle erwähnt wurde, bleiben nach Abbruch des Chromatogramms alle übrigen Substanzen von der Analyse ausgeschlossen. Bei diesem Versuch zielen wir nur auf die Bestimmung von Wasser, Äthanol und gegebenenfalls von Methanol ab.
- 8) Über den Optionsmenü-Punkt "Hardcopy" wird das Chromatogramm zusammen mit der Integrationsliste ausgedruckt.
- 9) Die am Chromatogramm ausgegebenen Prozentwerte der Peaks in die folgende Ergebnisliste übertragen und die Werte der von den anderen Gruppen untersuchten Proben übernehmen.

Probe	----- %-Verteilung auf -----		
	H ₂ O	Methanol	Äthanol
a)
b)
c)
d)
e)

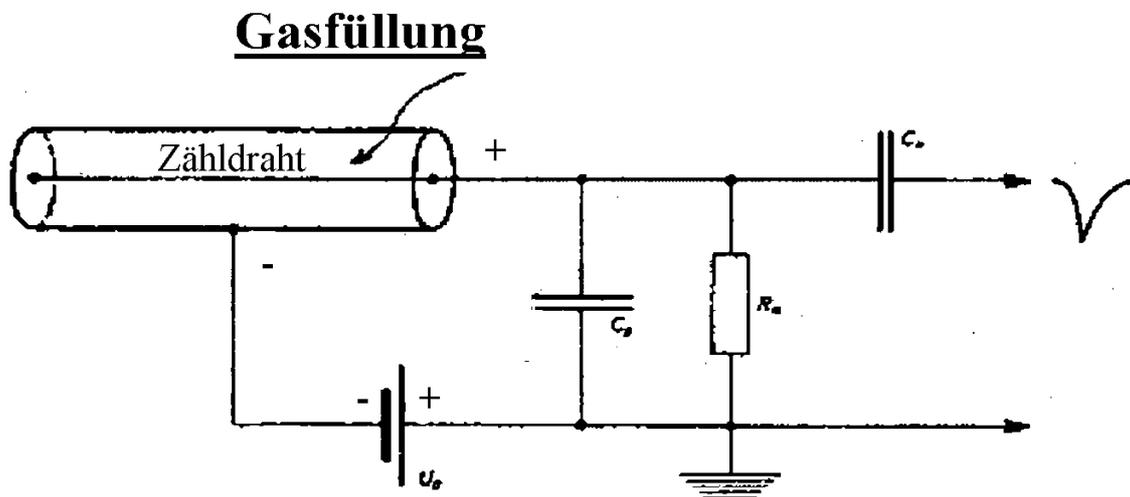
6. Arbeitstag

Demonstration radiochemischer Messungen.

Versuchsziel: Einführung in radiochemische Arbeitsweisen und Auswertungsverfahren.

A) Kurze Wiederholung der Theorie zur Messung radioaktiver Strahlung.

B) **Geiger-Müller-Zählrohr**(GMZ) (aus: „Kern- und Strahlentechnik“, Lehrbriefe der Studiengemeinschaft Darmstadt)



Anordnung und Schaltung eines Zählrohrs

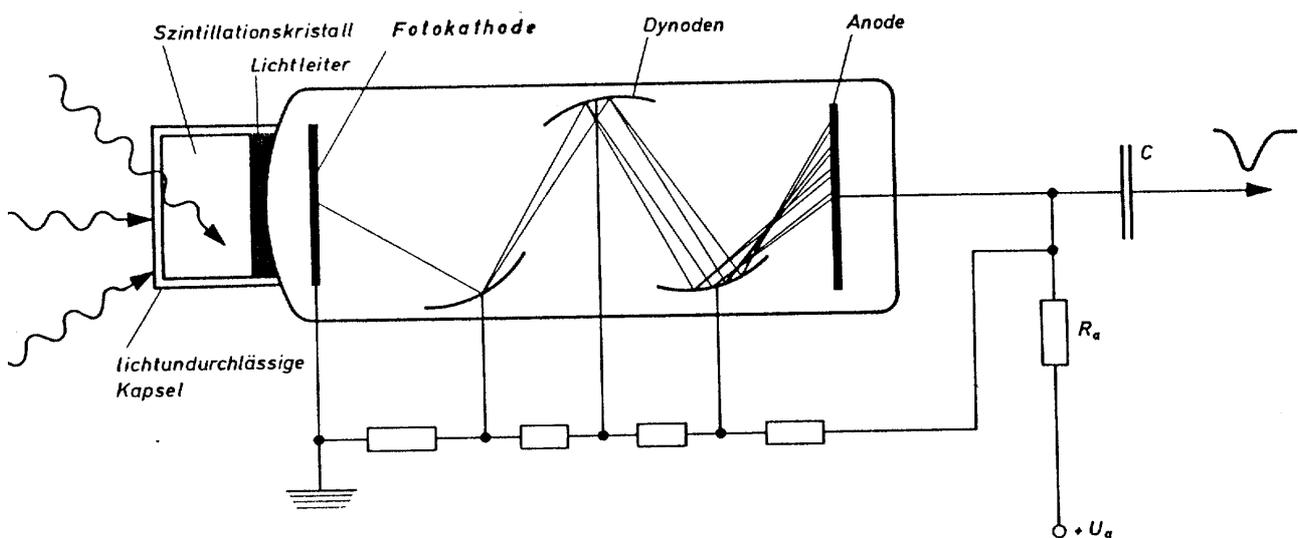
Nachweis jeglicher radioaktiver Strahlung, keine Lieferung steigender Impulshöhen bei steigender Energie der Strahlung.

(Ausbeute ca. 1%)

- 1.) Radioaktive Strahlung hörbar gemacht: Radioaktive Strahlung entsteht spontan und zufällig (Poisson-Verteilung!);
- 2.) Nachweis der Notwendigkeit eines leicht ionisierbaren Gases im GMZ (Einsatz eines defekten GMZ mit offenem Endfenster (ultradünnes Glimmer-Plättchen, Einschluß des leicht ionisierbaren Gasmisches);

3.) Nachweis der Notwendigkeit von Hochspannung (HV) zum Betrieb jeden Zählrohrs (bei Abschalten der HV keine Strahlungsmessung!!). Dabei muß die Abhängigkeit der Zählrate von der Höhe der Hochspannung bei stufiger Erhöhung der Hochspannung schrittweise aufgenommen werden. Die Arbeitsspannung liegt im ersten Drittel des sich ergebenden Plateaus. Man beachte dabei, daß ein Zählrohr durch Überschreiten der Maximalspannung defekt werden kann.

C) γ -Kristall-Szintillationszählrohr (GKSZ): (aus: „Kern- und Strahlentechnik“, Lehrbriefe der Studiengemeinschaft Darmstadt)



Messung von γ -Quanten unter Erfassung unterschiedlicher Impulshöhen in Abhängigkeit von der Strahlungsenergie, daher γ -Spektrometrie möglich. (Ausbeute ca. 10-30%)

1.) Bedeutung von Abschirmungsmaßnahmen für die Strahlungsmessung:

Versuch: Messung der Umwelt- γ -Strahlung mit dem GKSZ bei unterschiedlichen Abschirmungsmaßnahmen mit Blei während einer Meßzeit von 1 Minute

	<u>a) ohne Pb-Abschirmung</u>	<u>mit b) Pb-Abschirm- Ringen</u>	<u>mit c) Berthold-Pb-Ab- schirmung</u>
Zählrate (IpM)	_____	_____	_____

Ergebnis: α - oder β -Strahlung ist bereits durch dünnes Blech vollständig zu absorbieren. Die Intensität von γ -Untergrundstrahlung (terrestrisch, kosmisch) ist dagegen durch zunehmende Dicke der Bleiabschirmung wohl zu reduzieren, aber nicht vollständig zu löschen. Daher muß die Untergrundstrahlung bei jeder Radioaktivitätsmessung gesondert erfaßt und von der Proben-Zählrate subtrahiert werden.

Merksatz: Ein Blatt Papier reicht zur Absorption von α -Strahlung, ein Brockhaus-Band zur Absorption von β -Strahlung, der 24-bändige Brockhaus (incl. Ergänzungsbände) reicht jedoch nicht aus, um γ -Strahlung vollständig abzuschirmen!

2.) Wie sicher sind Radioaktivitätsmeßwerte - Zählstatistik:

a) Einzelmessung

Bei einer genügend großen einzeln gemessenen Impulszahl ist die Standardabweichung (s):

$$s = \frac{\sqrt{\text{IMPULSZAHL}}}{\text{Meßzeit (Min.)}}$$

Beispiele zur statistischen Beurteilung einer Messung einzelner, unterschiedlich lange gezählter Impulssummen:

<u>Meßwert</u> (Impulse)	<u>Meßzeit</u> (Min.)	<u>Standard- abweichung</u> (absolut)	<u>Standard- abweichung</u> (in % vom Ergebnis)	<u>Ergebnis</u>
10	1	3.2	32	10 IpM ± 3.2 IpM
100	1	10	10	100 IPM ± 10 IpM
1000	1	32	3.2	1000 IpM ± 32 IpM
10000	1	100	1	10000 IpM ± 100 IpM
1000	10	32/10=3.2	3.2	100 IpM ± 3.2 IpM
1000	5	32/5=6.4	3.2	200 IpM ± 6.2 IpM
1000	2	32/2=16	3.2	500 IpM ± 16.0 IpM

Der unter C-1) angeführte Versuch zur Wirkung von Abschirmungsmaßnahmen auf die Messung der γ -Umweltstrahlung wäre demnach wie folgt auszuwerten:

	a) ohne Pb- Abschirmung	mit Pb- b) Abschirm- Ringe	mit c) Berthold-Pb- Abschirmung
Zählrate (IpM)	_____	_____	_____
Standard- abweichung (s) (IpM)	± _____	± _____	± _____

Ergebnis: Da der radioaktive Zerfallsprozeß ein unabhängiger, zufälliger, seltener und unregelmäßig auftretender Vorgang ist, kann nicht vorhergesehen werden, wann der nächste Zerfall eintreten wird (ähnliche Ereignisse sind z.B: die Anzahl Telefonate pro Tag, die Anzahl Rosinen in einem Kuchenstück, die Anzahl Tippfehler pro Seite, die Anzahl von Unwettern in einem Jahr oder das Wetter des nächsten Tages).

Jede Einzelmessung solcher Ereignisse, wie z.B. der Radioaktivität, wird aber um so sicherer, je länger der Zeitabschnitt für ihre Messung gewählt wird. Die bei kurzer Meßzeit solcher Ereignisse gültige Poisson-Verteilung wird bei einer größeren Meßdauer der Normal-Verteilung ähnlich (**s.u.**) und es wird zulässig, die Standardabweichung aus der Summe solcher Ereignisse zu bestimmen. Sie gibt an, mit welcher Schwankungsbreite bei einer neuerlichen Messung des gleichen Präparates unter den gleichen Bedingungen zu rechnen wäre.

Wurde z.B. ein Präparat innerhalb **30 Minuten** gezählt und man zählte dabei **50000 Impulse**, so beträgt die Standardabweichung dieses Meßwertes;

$$s = \frac{\sqrt{50000}}{30}; s = 7.5; \text{ , das Meßergebnis ist somit: } \underline{\underline{1667 \text{ IpM} \pm 7.5 \text{ IpM}}}$$

Dies bedeutet, daß bei einer neuerlichen Messung des gleichen Präparates der zu erwartende Meßwert mit einer statistischen **Wahrscheinlichkeit von 68.3%** zwischen $1667 - 7.5 = \mathbf{1659}$ und $1667 + 7.5 = \mathbf{1675}$ liegen würde. Will man die statistische Sicherheit der Aussage des Ergebnisses erhöhen, rechnet man mit dem doppelten Wert der Standardabweichung. Dann könnte man mit **95% Sicherheit** von einem zu erwartenden Meßwert zwischen 1652 und 1682 ausgehen.

Dieses Verfahren ist nur bei Nukliden mit längerer Halbwertszeit bei längeren Messungen anzuwenden, die aufgrund ihrer Meßdauer nicht beliebig oft wiederholt werden können. Für die Auswertung von Messungen mit einzelnen Wiederholungen gelten dagegen die üblichen statistischen Gesetze zur Prüfung von Verteilungen (s. nächster Versuch).

4.) Kurzzeitig gezählte Ergebnisse von Radioaktivitätsmessungen sind Poisson-verteilt!

b) Meßwiederholungen

Das Ziel dieses Versuches besteht darin, zu zeigen, daß die Messung seltener Ereignisse innerhalb einer mit Absicht zu kurz gewählten Zeitspanne nur sehr ungenau über den aus Parallelmessungen arithmetisch errechneten Mittelwert und die Standardabweichung auszuwerten ist. Wie anhand von im Labor ermittelten Parallelwerten (**Tab. 14.1**) gezeigt werden kann, sind 50 innerhalb 0.015 Minuten ermittelte Meßwerte der Umweltstrahlung nicht normal-verteilt (s. **Abb. 14.1**), es liegt vielmehr eine schiefgipfelige Poisson-Verteilung vor. Das arithmetische Mittel ist **2.32** mit einer Standardabweichung (die es bei Poisson-Verteilung nicht gibt, deren Berechnung ohne statistischen Sinn wäre!) von **1.449 (63% vom Mittelwert!)**, wobei dieser Mittelwert mit dem Maximum der Poisson-Verteilung nicht deckungsgleich ist.

Unter den gleichen Bedingungen wurden daraufhin 25 Meßwiederholungen während einer Minute gezählt. Aus **Abb. 14.2** ist zu erkennen, daß bereits nach der Meßzeit von 1 Minute eine weitgehende Normalverteilung zu erreichen ist. Der Mittelwert dieser zweiten Meßreihe liegt bei **160.0**, die Standardabweichung beträgt **11.1 (7% vom Mittelwert!)**. Wie bei einem Vergleich der beiden Mittelwerte zu erkennen ist, wird bei der Kurzzeit-Messung ein zu niedriger Mittelwert ermittelt ($2.32 \cdot 1.000 / 0.015 = 154.7$), der zwar, auf eine Meßzeit von 1 Minute umgerechnet, noch innerhalb der Schwankungsbreite von **160.0 ± 11.1** liegt.

Dieser Versuch ist nun aus Zeitgründen mit jeweils 5 Meßwiederholungen zu wiederholen und nach den angegebenen Formeln für die Ermittlung von Mittelwert und Standardabweichung auszuwerten:

$$\text{Mittel} = \frac{\sum X}{N} \qquad s = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}}{(N-1)}}$$

X = Meßwiederholung; N = Anzahl Werte

Versuchsauswertung:

<p>5 Meßwerte (Meßzeit 0.015 Min.)</p> <p>_____</p>		
<p>5 Meßwerte (Meßzeit 1.000 Min.)</p> <p>_____</p>		
<p><u>Auswertung der beiden Meßreihen:</u></p>		
<p>Meßzeit:</p>	<p>0.015 Min.</p>	<p>1.000 Min.</p>
<p>Mittelwert:</p>	<p>_____</p>	<p>_____</p>
<p>Standard- Abweichung (s)</p>	<p>± _____</p>	<p>± _____</p>
<p>(s in % vom Mittelwert):</p>	<p>(± _____%)</p>	<p>(± _____%)</p>

Ergebnis:

Wie oben bereits beschrieben, sind die Ergebnisse von innerhalb zu kurzer Zeit gemessenen Zählraten von seltenen Ereignissen bei arithmetischer Mittelung der Meßwiederholungen nicht korrekt, da die Einzelwerte nicht normal-, sondern Poisson-verteilt sind. **Bei der Messung von Radioaktivität erreicht man erst durch die Verlängerung der Meßzeit bei genügend großer Anzahl an Wiederholungen die Normal-Verteilung. Erst dann ist die Berechnung der Standardabweichung nach der Formel für Einzelmessungen zur Beurteilung der statistischen Sicherheit eines Mittelwertes zulässig.**

5.) Messung der Gesamt- γ -Radioaktivität in einer Pilzprobe aus Tschechien

Anwendung der gezeigten Zusammenhänge auf die Messung der γ -Radioaktivität in einer Steinpilz-Probe mit dem GKSZ (in Berthold-Abschirmung) als Vorbereitung

auf den Versuch zur Identifizierung und Aktivitätsbestimmung einzelner γ -Nuklide in dieser Pilzprobe. Die Meßdauer sollte dabei mindestens 5 Minuten betragen.

Versuch: Messung von 64.3g getrockneter Steinpilze aus Tschechien				
	<u>Impulse</u>	<u>Meßzeit</u> (Min.)	<u>Standard- Abwei- chung</u>	<u>Ergebnis</u>
Nulleffekt+ Pilzprobe:	_____	___	_____*)	_____IpM ± _____IpM
Nulleffekt	_____	___	_____*)	_____IpM ± _____IpM
Pilzprobe:	_____	___	_____+)	_____IpM ± _____IpM

*) Formel für die Standardabweichung einzelner Meßwerte:

$$s = \frac{\sqrt{IMPULSZAHL}}{Meßzeit (Min.)};$$

+) Formel für die Standardabweichung der Pilzprobe unter Berücksichtigung des Anteils der Untergrundstrahlung:

$$s = \sqrt{\frac{IMPULSE (P + N)}{Meßzeit (P + N)^2} + \frac{IMPULSE (N)}{Meßzeit (N)^2}};$$

(P+N) = von Probe + Nulleffekt

(N) = von Nulleffekt)

Ergebnis:

Pilze, Nüsse, eventuell Milchpulver können auch heute noch, je nach Örtlichkeit ihrer Produktion, in unterschiedlichem Maße γ -Radionuklide mit längerer Halbwertszeit

enthalten, die anlässlich der Tschernobyl-Katastrophe im Jahre 1986 über die Welt verteilt wurden. Mit der in diesem Versuch durchgeführten Messung erhalten wir eine grobe Information darüber, ob die Probe als kontaminiert einzustufen ist.

6.) Ermittlung der γ -Radioaktivität der Hauptkomponenten einer in Tschechien gesammelten Steinpilz-Probe:

Nach der vorherigen Bauschalyse ist nicht bekannt, welche einzelnen γ -Radionuklide die Gesamtzählrate der Probe ausmachen und wie eine eventuelle potentielle Gefährdung bei dem Verzehr dieses Nahrungsmittels zu beurteilen ist. Dabei soll nur auf Energie und Halbwertszeit von vorhandenen Radionukliden, nicht aber auf deren Aufnahme aus der Nahrung, Wirkung im Körper und biologische Verweildauer eingegangen werden.

Identifizierung und Strahlungsbestimmung der Hauptkomponenten vorhandener γ -Radionuklide erfolgen wiederum mit dem GKSZ mit einem NaJ-Kristall, wobei anstelle des Impulzzählers eine Computer-gesteuerte Vielkanal-Meßeinrichtung verwendet wird (**Im GKSZ besteht strenge Proportionalität zwischen Impulshöhe und Energie der vorhandenen Gamma-Radionuklide!!**).

Versuch:

(Beschreibung und Arbeitsanleitung zu diesem Versuch s. Vers. 17)

<u>zu erwartendes γ-Radionuklid</u>	<u>Zählrate (Imp./sec.)</u>	<u>Zerfallsrate (Bq)</u>	<u>Standard- abweichung (%)</u>
^{134}Cs	_____	_____	_____
^{137}Cs	_____	_____	_____
^{40}K	_____	_____	_____

Eigenschaften dieser Radionuklide

<u>γ-Radionuklid</u>	<u>γ-Energie (MeV)</u>	<u>Halbwertszeit</u>	<u>Zerfallsart</u>
^{134}Cs	0.796	2.15 Jahre	β^- , γ
^{137}Cs	0.661*)	30 Jahre*)	β^- *)
^{40}K +)	1.46	$1.28 \cdot 10^9$ Jahre	β^- , K +)

*) ^{137}Cs zerfällt unter Aussendung von β^- -Strahlung zu $^{137\text{m}}\text{Ba}$. Dieses Nuklid liegt nur sehr kurz in angeregtem Zustand vor und geht unter Aussendung von γ -Quanten in den energetischen Grundzustand über.

+) ^{40}K ist ein Radionuklid unter den übrigen, nicht radioaktiven Kalium-Nukliden. Es sendet zu etwa 89% β^- -Strahlung und zu etwa 11% K-Strahlung aus. Dies ist eine charakteristische Röntgen-Strahlung, die aufgrund von electron capture (=Elektroneneinfang) durch den Kern aus der K-Elektronenschale entsteht. Röntgenstrahlung ist wie Gamma-Strahlung elektromagnetischer Natur und wird durch den GKSZ erfaßt.

D) Allgemeine Ausführungen zu der weiteren Auswertung radiochemischer Meßwerte

Nun ist die Zählrate eines Präparates bekannt, auch ihre statistische Absicherung. Entspricht nun eine Zählrate der Zerfallsrate eines Radionuklids? Die Antwort ist

NEIN!

Zählrate \neq Zerfallsrate !!

IpM \neq DpM !!

Erst durch Eichung wird aus der Zählrate die Zerfallsrate. Die Eichung erfolgt, indem unter genau gleichen apparativen Bedingungen wie bei der Probemessung und bei

gleicher physikalischer Beschaffenheit wie bei der Probe eine (oder mehrere) Standardprobe(n) mit bekannter Zerfallsrate (Radioaktivität) gemessen wird (werden).

Eine Meßreihe habe z.B. folgende Ergebnisse erbracht:

Zählrate Probe: 1000 IpM ± 1%

Zählrate Standard: 10000 IpM ± 1%
(= 0.1 µCi)

**1 Ci (Curie) = $2,22 \cdot 10^{12}$ Zerfälle pro Minuten (DpM), daher entspricht
0.1 µCi $2,22 \cdot 10^5$ DpM.**

**Es muß also folgende Beziehung gelten, die nach den Regeln eines Dreisatzes
aufzulösen ist:**

$$2,22 \cdot 10^5 \text{ (DpM) / 10000 (IpM) = X(DpM) / 1000 (IpM);}$$

$$X \text{ (DpM) = } 2,22 \cdot 10^5 \cdot \frac{1000}{10000} \text{ (DpM);}$$

$$\underline{X \text{ (DpM) = } 2,22 \cdot 10^4 \text{ (DpM)}}$$

Anmerkung:

**Die gültige Einheit der Radioaktivität ist das Becquerel (Bq).
(die Einheit Curie wird aber immer noch verwendet)**

$$\underline{1 \text{ Bq} = 1 \text{ Zerfall/Sekunde}} \\ \underline{37000 \text{ Bq} (=37\text{kBq}) = 2,22 \cdot 10^6 \text{ DpM} = 1 \text{ µCi!}}$$

Nun ist schließlich die Zerfallsrate, die Strahlungsintensität, die Radioaktivität einer Probe ermittelt. Es fehlen nur noch einige Gesichtspunkte, die man sich zur Interpretation eines Ergebnisses aus der Radiochemie zunutze machen sollte:

- a) Bei der Untersuchung der Pilzprobe interessierte beispielsweise, welche Radioaktivität in welcher Pilzmenge, frisch oder trocken, enthalten ist und welche Menge man davon zu verzehren gedenkt. Wenig Pilzmasse für eine delikate Gemüsesuppe, einmal im Monat genossen, dürfte wohl keinesfalls schädlich sein?!

b) Doch wie erfolgt die Interpretation der Messungen biochemischer Proben? Da ist sicherlich die entsprechende Versuchsfrage maßgeblich, jeder Versuch wird entsprechend seiner Fragestellung spezifisch ausgewertet. Aber eine Frage gilt es wohl immer zu beantworten: Welche Radioaktivität ist in welcher Menge meiner Substanz, die man z.B. mit ^3H oder ^{14}C „markieren“ wollte.

Dafür gibt es einen Begriff, die sogenannte „spezifische Radioaktivität“, die angibt, wieviel Impulse/Min. oder Zerfälle/Min. in einer bestimmten Substanzmenge vorliegen, wie hoch also der „Markierungsgrad“ ist:

$$\text{spezifische Radioaktivität} = \frac{\text{Radioaktivität}}{\text{Konzentrationseinheit}} \quad \text{oder}$$

$$\text{spezifische Radioaktivität} = \frac{\text{Radioaktivität}}{\text{Mengeneinheit}}$$

Einige Beispiele:

- 1.) Bei der Untersuchung der Enzymaktivität mit radioaktiven Substraten wird die wiedergefundene Radioaktivität von z.B. applizierter „heißer“ ^{14}C -Glucose-Lösung auf die Menge an ebenfalls zugesetzter „kalter“ ^{12}C -Glucose-Lösung bezogen, um aus der gemessenen Radioaktivität die umgesetzte Substratmenge und demnach die Enzymaktivität errechnen zu können. Entspricht z.B. die spezifische Radioaktivität einer applizierten Substrat-Lösung 1 mCi/10 mMol (oder anders ausgedrückt $2,22 \cdot 10^9$ DpM /10 mMol), dann entspricht die in einer Substratprobe gemessene Radioaktivität von $2,22 \cdot 10^6$ DpM einer Substratmenge von 10 μMol , woraus der Substratumsatz des Enzyms pro Zeiteinheit, die Enzymaktivität, berechnet werden kann.
- 2.) Bei der Untersuchung eines Stoffwechselablaufs wird zunächst z.B. die in Glucose vorhandene Radioaktivität auf die per HPLC bestimmte Glucose-Menge bezogen, um über die so erhaltene spezifische Glucose-Radioaktivität den Markierungsgrad (=die spezifische Radioaktivität) von ebenfalls ermittelten Glucose-Abbauprodukten einordnen zu können: Abbauprodukte mit hoher spezifischer Radioaktivität dürften an prominenter Stelle im Abbauweg der markierten Glucose stehen.
- 3.) An Pulse-/Chase-Experimenten wird in einer Pulsphase unter Verabreichung eines z.B. ^{14}C -markierten Präcursors die spezifische Radioaktivität von Stoffwechsel-Abbauprodukten dieser Substanz ermittelt. In einer darauf folgenden Chase-Phase

wird der gleiche Präcursor ohne Markierung (^{12}C) verabreicht. Nach dieser Chase-Phase wird nun wieder die spezifische Radioaktivität der gleichen Metaboliten ermittelt. Das Ausmaß der „Verdünnung“ der spezifischen ^{14}C -Radioaktivität der Pulse-Phase durch ^{12}C im Verlauf der Chase-Phase ermöglicht somit Einblicke in die Stoffwechsel-Labilität bzw. -Stabilität von untersuchten Substanzen.

Dazu ein Beispiel:

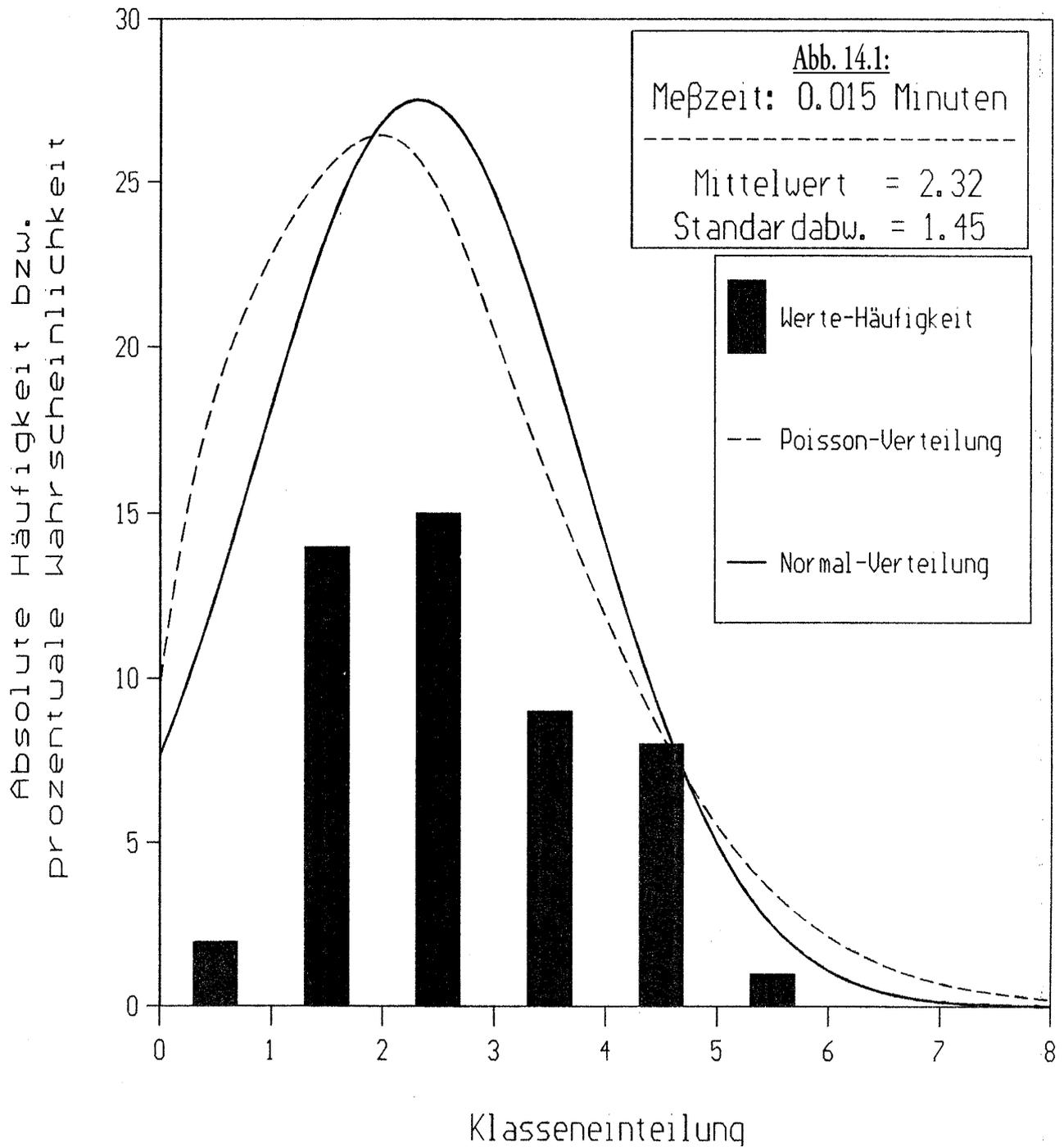
	DpM ^{14}C/mg Protein nach Puls-Phase	DpM ^{14}C/mg Protein nach Chase-Phase
Protein A	800000	400000
Protein B	700000	600000

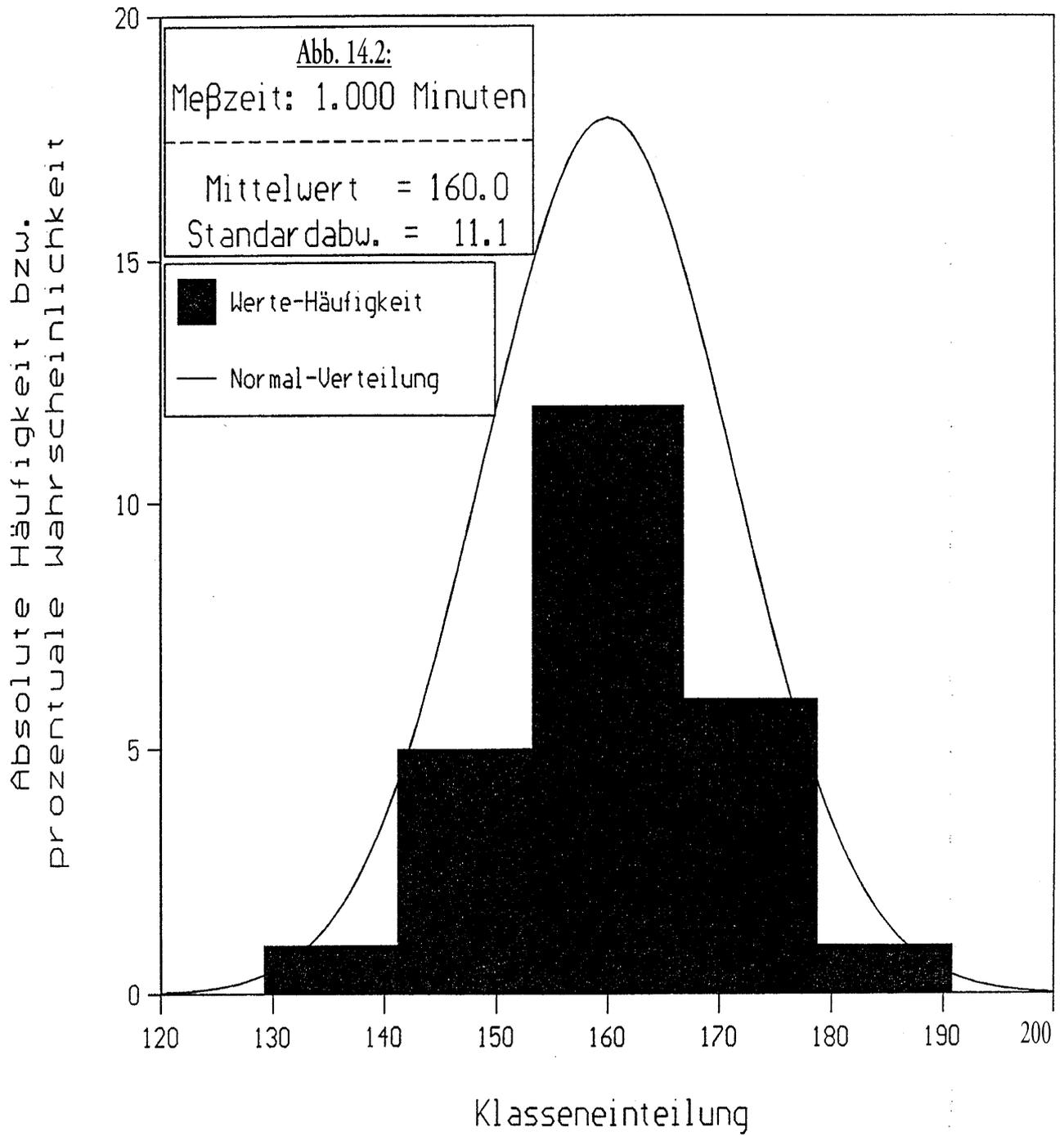
Ergebnis: Protein B ist demnach metabolisch stabiler als Protein A!

Wurde z.B. für die Pulse-Phase ^{14}C -markiertes Leucin verwendet, so kann unter Berücksichtigung seiner zu Versuchsbeginn vorliegenden spezifischen Radioaktivität nach Ermittlung der Leucin-Konzentration in beiden Proteinen auch dessen Konzentration in den beiden Proteinen berechnet werden.

Tab. 14.1 Meßwerte für Abb. 14.1, 14.2

Nr.	W14:	W1: 0.015 Min.	W21: 1.00 Min
1	1	3	158
2	2	3	162
3	3	2	171
4	4	2	148
5	5	1	144
6	6	3	159
7	7	3	161
8	8	3	161
9	9	4	156
10	10	8	130
11	11	1	166
12	12	1	174
13	13	4	153
14	14	1	159
15	15	1	167
16	16	2	167
17	17	2	153
18	18	4	154
19	19	1	165
20	20	1	159
21	21	2	187
22	22	2	165
23	23	2	174
24	24	1	153
25	25	3	154
26	26	2	
27	27	1	
28	28	0	
29	29	2	
30	30	4	
31	31	2	
32	32	2	
33	33	3	
34	34	1	
35	35	1	
36	36	3	
37	37	2	
38	38	1	
39	39	4	
40	40	1	
41	41	0	
42	42	3	
43	43	5	
44	44	2	
45	45	4	
46	46	2	
47	47	4	
48	48	4	
49	49	2	
50	50	1	





6. Arbeitstag:

Bestimmung der Zählausbeute von ^3H - und ^{14}C -Proben im Flüssig-Scintillationszähler.

Versuchsziel: Messung niederenergetischer β -Strahler bei hoher Zählausbeute mittels Flüssig-Scintillationszähler (LSC).

A) Prinzip (s. Einleitung, s.S. 5)

Zur Markierung verschiedenster Substanz-Klassen im Stoffwechsel werden hauptsächlich Tritium (^3H), ^{14}C , ^{32}P und ^{35}S z.B. zur Markierung von Metaboliten oder von Proteinen und Nukleinsäuren (s. S. 218), verwendet.

Zur Messung von niederenergetischen β -Radionukliden müssen Meßverfahren mit möglichst hoher Ausbeute eingesetzt werden, um auch relativ schwach markierte Substanzen bei guter Meßgenauigkeit erfassen zu können. Die Zählrate eines Strahlungs-Meßgerätes ist um so größer, je höher seine Zählausbeute ist. Somit scheiden Meßanordnungen mit Geiger-Müller- oder Proportional-Zählrohren mit z.T zu geringer Meßausbeute aus (**s. Tab. 15.1**).

Tab. 15.1: Bestimmung der Zählausbeute für ^{14}C und ^{32}P mit verschiedenen Meßverfahren (Institutmessungen)

Radionuklid (E_{max})	Zerfallsrate		Zählrate		Errechnete Ausbeute (in %)
	Standard (in DpM)	Meßver- fahren *)	Standard (in IpM)		
^{14}C (0.156 MeV)	3885000	GMZ	44790	1.2	
	3885000	MDZ	26913	6.9	
	102300	LSC	78673	76.9	
^{32}P (1.71 MeV)	333000	GMZ	39487	11.9	
	333000	MDZ	115351	34.6	
	214594	LSC	168756	78.6	
*)	GMZ = Geiger-Müller-Meßplatz; MDZ = Methan-Durchfluß-Zähler; LSC = Flüssig-Scintillations-Zähler				

Seit den 70er Jahren gibt es hochentwickelte Geräte zur empfindlichen und genauen Messung von ^3H und ^{14}C nach dem Prinzip der Flüssig-Scintillations-Spektrometrie (oder auch Flüssig-Scintillations-Zähler; englisch: LSC = Liquid Scintillation Counter). Damit sind, je nach Geräte-Ausstattung, Ausbeuten von über 60% für ^3H und von über 90% für ^{14}C damit zu erreichen.

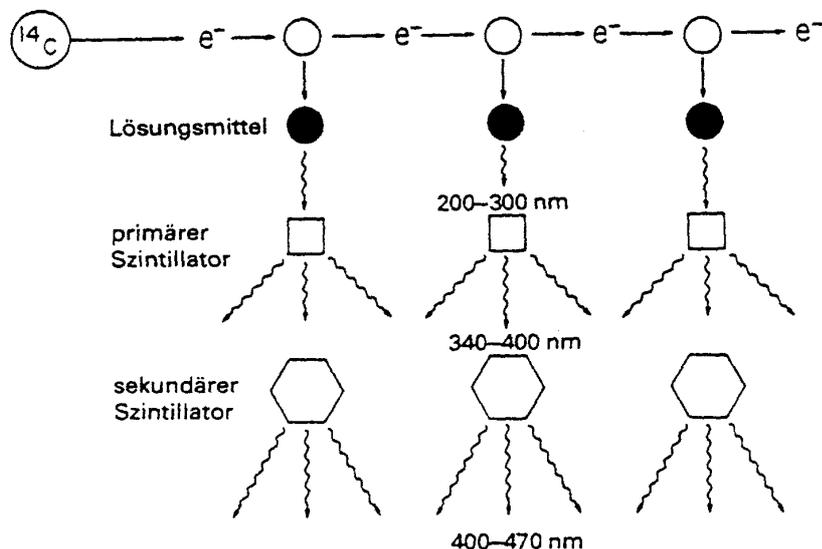
Das Prinzip der Radioaktivitätsmessung mit dem LSC beruht darauf, daß aliquote Teile einer Probe markierter Substanzen mit einem Gemisch flüssiger organischer

Scintillatoren ("Scintillator-Cocktail") in einem durchsichtigen Probengefäß (Vial) aus geeignetem Plastikmaterial oder Glas vermischt werden. Durch die β -Strahlung von ^3H oder ^{14}C werden Scintillator-Moleküle kurzzeitig angeregt. Zum Erreichen ihres energetischen Grundzustandes erfolgt die Abgabe der Anregungsenergie in Form von Lichtquanten, die in einer geeigneten Anordnung gemessen werden können. **Die Anregung von Scintillator-Molekülen und damit die Menge der abgestrahlten Lichtquanten sind dabei direkt proportional der Energie der anregenden β -Strahlung.**

A-1) Anregungsvorgänge im Scintillator

Aus **Abb. 15.1** ist der Prozeß der Anregung von Molekülen des Scintillator-Cocktails durch β -Strahlung zu ersehen. Die β -Strahlung aus der mit dem Cocktail vermischten markierten Probe trifft zunächst auf die in großer Menge vorliegenden Lösungsmittel-Moleküle (meist Toluol oder Xylol, **s. Abb. 15.2**), führt zu deren Anregung und schließlich zur Abstrahlung von Lichtquanten mit einer Wellenlänge von 200-300 nm. Wie später bei der Besprechung der apparativen Ausstattung eines LSC gezeigt wird (**s. A-2**), kann Licht bei dieser Wellenlänge jedoch noch nicht zur Messung gelangen. Im Scintillator-Cocktail sind daher "primäre" und "sekundäre" organische Scintillatoren in geringer Konzentration vorhanden, die infolge ihrer Fluoreszenz Licht mit längerer Wellenlänge abgeben. Der primäre Scintillator (z.B. PPO, **s. Abb. 15.2**) wird durch die Lichtquanten des Lösungsmittels angeregt und strahlt Licht bei 340-400 nm ab. Aber auch diese Wellenlänge kann apparativ noch nicht empfindlich genug ausgewertet werden. Erst der sekundäre Scintillator (z.B. POPOP, **s. Abb. 15.2**) wird durch Lichtquanten der primären Scintillatoren zur Abgabe von Licht mit einer Wellenlänge von 400-470 nm angeregt. Diese Wellenlängen fallen mit dem Maximum der Meßempfindlichkeit der Photokathode (**s. Abb. 15.3**) von sogenannten "Photo-Multipliern" (PM) oder auch "Sekundär-Elektronen-Vervielfachern" (SEV) zusammen.

Abb. 15.1: Anregung von Szintillator-Molekülen und Eigenschaften verschiedener Lösungsmittel (Aus COOPER, 1981).

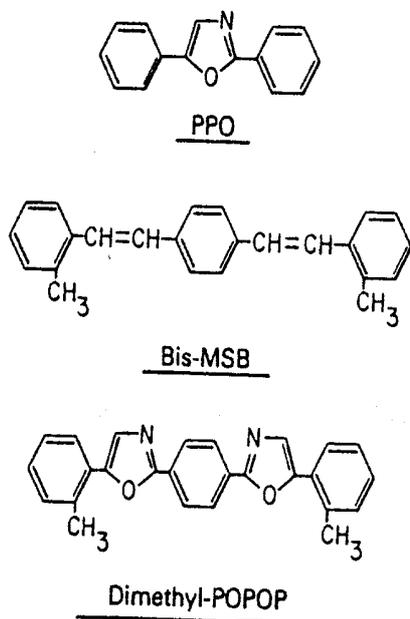


Wechselwirkung der β -Teilchen mit dem aromatischen Lösungsmittel und anschließender Fluoreszenz-Abstrahlung. e^- repräsentiert das β -Teilchen. o ist das Lösungsmittel-Molekül im Grundzustand, • bedeutet, daß sich das Molekül im angeregten Triplet-Zustand befindet.

Relative Zählausbeute verschiedener Lösungsmittel .

Verbindung	relative Zählausbeute (%)
Toluol	100
Methoxybenzol (Anisol)	100
Xylol	97
1,3-Dimethoxybenzol	81
1,4-Dioxan	70
Ethylenglykol-dimethylether	60
Aceton	12
Tetrahydrofuran	2
Ethanol	0
Ethylenglykol-monomethylether	0
Ethylenglykol	0

Abb. 15.2: Angaben zu primären und sekundären Scintillatoren (aus: COOPER, 1981).



Struktur der gebräuchlichsten primären und sekundären Szintillatoren.

Fluoreszenz-Maxima verschiedener Szintillatoren in Toluol.

Name	MG	Fluoreszenz-Maxima (nm)		
		λ_1	λ_2	λ_3
<i>Primäre Scintillatoren</i>				
Naphthalin	128	325	336	351
Anthracen	178	405	428	454
Terphenyl	230	355		
PPO (2,5-Dephenyloxazol)	221	365	380	
PBD (2-Phenyl-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol)	298	364	377	
Butyl-PBD (2-(4-t-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol)	354	367	382	
BBOT (2,5-Bis(5-t-butylbenzoxazol-2-yl)thiophen)	430	438		
<i>Sekundäre Scintillatoren</i>				
POPOP (1,4-Bis(5-phenyloxazol-2-yl)-benzol)	271	420	441	
DMPOPOP (1,4-Bis(4-methyl-5-phenyloxazol-2-yl)benzol)	392	430		
Bis-MSB (p-Bis(o-methylstyryl)-benzol)	310	423		

A-2) Apparative Voraussetzungen zum Betrieb eines LSC

Die Lichtmenge, die von den Bestandteilen des Scintillator-Cocktails nach Kollision mit β -Teilchen abgegeben wird, ist sehr klein und erfordert eine höchst empfindliche Meßanordnung. Das Hauptelement dieser Meßanordnung besteht aus dem bereits erwähnten Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (SEV). Meist wird das Probengefäß mit dem Scintillator-Cocktail zwischen zwei SEV in einer lichtdichten, mit schwerem Bleimantel gegen Umwelt-Radioaktivität abgeschirmten Kammer im Gerät angeordnet.

Wie **Abb. 15.4** zeigt, gelangen die vom Scintillator-Cocktail abgegebenen Lichtblitze auf eine bei 400 bis 500 nm maximal empfindliche Photokathode (**s. Abb. 15.3**), aus der dadurch Elektronen herausgeschlagen werden. Jedes dieser freigesetzten Elektronen wird durch positiv geladene Pralldynoden so stark beschleunigt, daß an diesen Dynoden von Stufe zu Stufe Sekundär-Elektronen herausgeschleudert werden, die ihrerseits wieder Sekundär-Elektronen freisetzen u.s.w. Auf diese Weise wird ein aus der Photokathode emittiertes Elektron um den Faktor 10^6 bis 10^8 vervielfacht. Der sich damit ergebende Elektronenstrom fließt von der Anode des SEV über einen Arbeitswiderstand ab, an dem sich ein Spannungsimpuls aufbaut, der, über einen Kondensator von der Hochspannung abgetrennt, elektronisch weiterverarbeitet und zur Messung der in der Probe vorhandenen Radioaktivität verwendet wird. Dabei ist nochmals zu betonen, daß die **im Scintillator-Cocktail durch die einfallende β -Strahlung ausgelösten Lichtmenge und die im SEV sich ergebende Impulshöhe proportional ist der Energie der zu messenden β -Strahlung.**

Mit elektronischen Mitteln wird der Spannungsimpuls vom SEV weiterverarbeitet (**s. Abb. 15.5**). Die Impulse der beiden SEV gelangen zunächst an eine sogenannte "Koinzidenz"-Schaltung, die nur die Impulse zum Verstärker weiterleitet, die von beiden SEV gleichzeitig abgegeben werden. Hierdurch ist es möglich, Impulse, die durch Umwelt-Radioaktivität in unterschiedlichem Maße von SEV I und SEV II aufgenommen wurden, von der Proben-Strahlung zu trennen und damit den "Background" der Messung gering zu halten. Die im Verstärker linear verstärkten Impulse gelangen schließlich zu sogenannten Diskriminatoren, die wegen der Proportionalität von Impulshöhe und Energie der gemessenen radioaktiven Strahlung aus der Amplitude der Impulse die Strahlungsanteile einzelner β -Radionuklide (z.B. ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S etc.) unterscheiden können. Jedem Diskriminator sind Zähler nachgeschaltet, welche das Zählergebnis in Zusammenwirken mit einem Zeitgeber als Zählrate (**Impulse/Min.**) auf der Anzeige-Einheit darstellen. Über einen Drucker werden die Meßergebnisse mit Proben- und Diskriminator-Identifikation auf einem Papierstreifen ausgegeben.

Abb. 15.3: Typischer Empfindlichkeitsverlauf der Photokathode eines Sekundär-Elektronen-Vervielfachers (SEV) (aus: ALLKOFER, 1971).

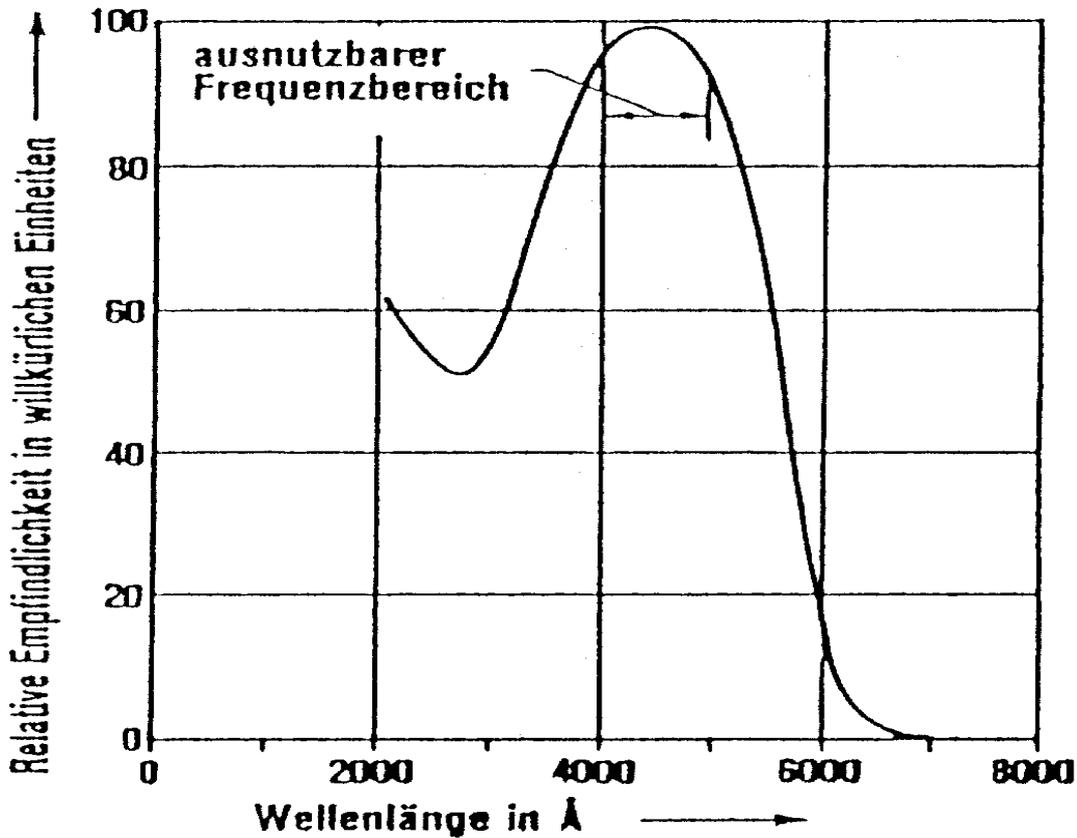


Abb. 15.4: Probengefäß und SEV zur Messung der Radioaktivität von niederenergetischer β -Strahlung mittels Flüssig-Scintillations-Zähler (LSC) (verändert aus „Kern- und Strahlentechnik“, Lehrbriefe der Studiengemeinschaft Darmstadt).

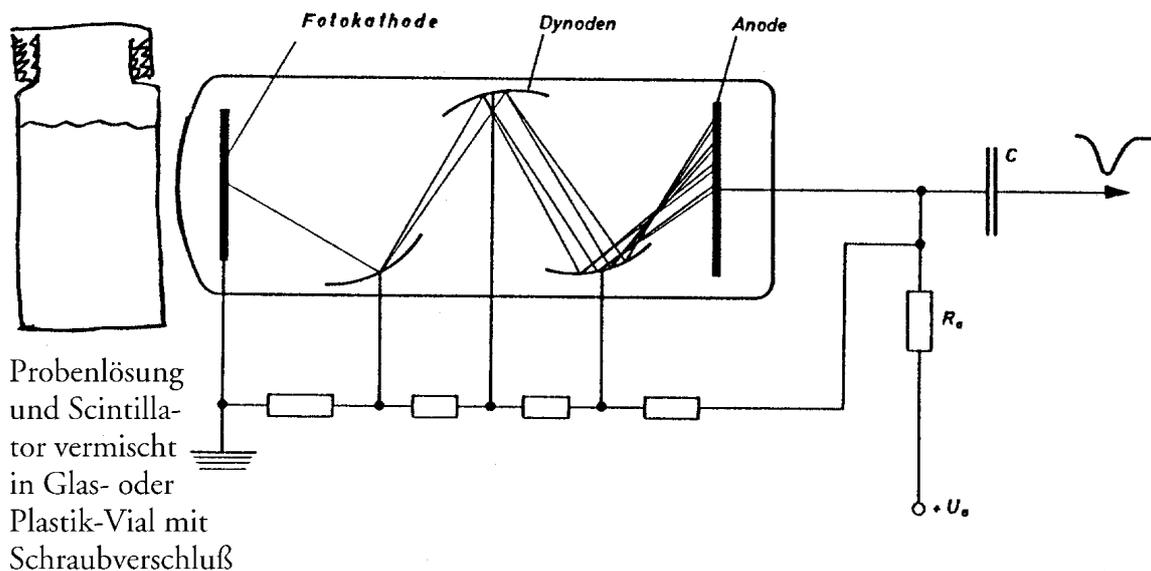
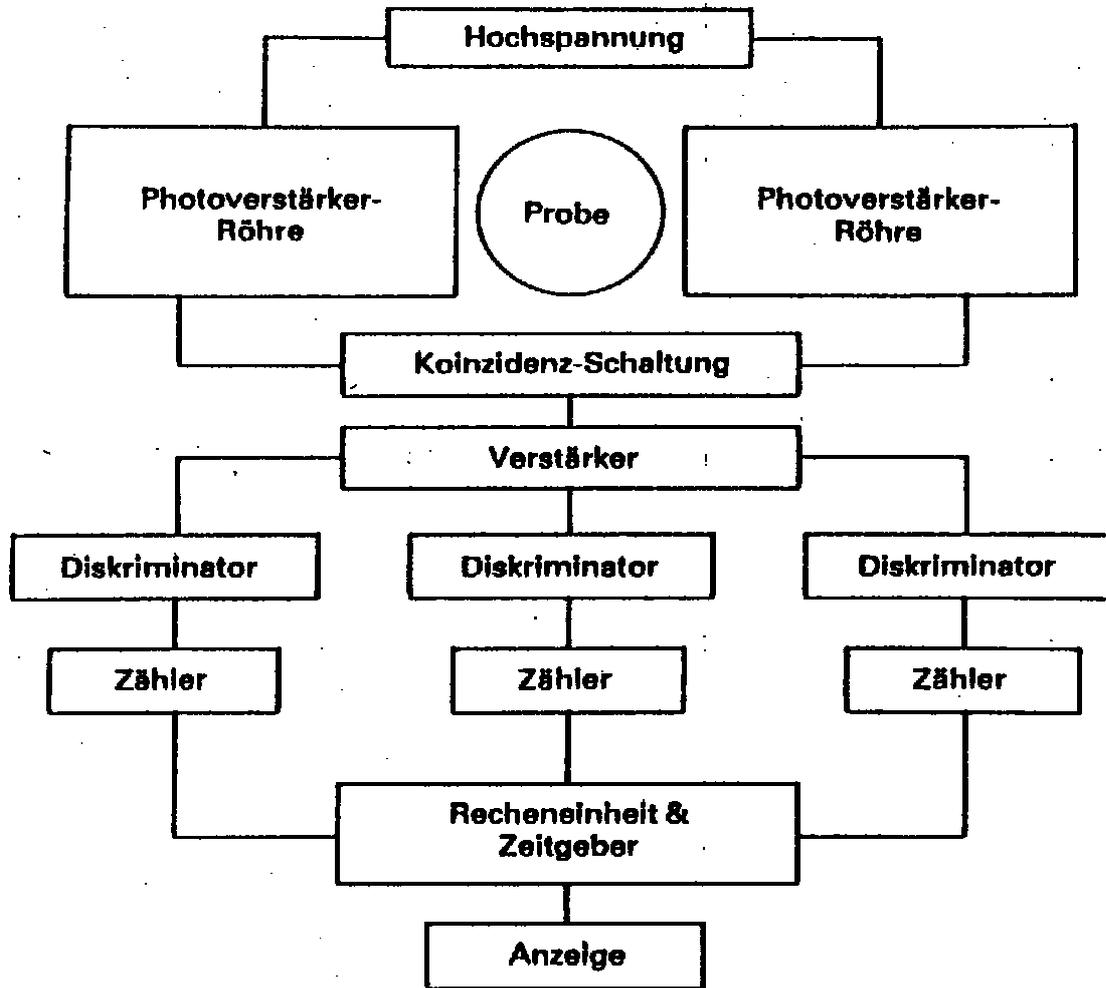


Abb. 15.5: Schematische Darstellung der wichtigsten elektronischen Baugruppen eines LSC (aus: COOPER, 1981)



Der uns zur Verfügung stehende LSC verfügt über die Möglichkeit, 100 Proben ein- oder mehrmals hintereinander automatisch zu messen. Hierbei kann auch bestimmt werden, mit welcher Diskriminator-Einstellung einzelne Proben gemessen werden sollen.

B) Material

- a) ^3H - und ^{14}C -Standards bekannter Radioaktivität in Plastik-Vials mit Scintillator-Cocktail;
- b) Flüssig-Scintillations-Zähler von Philips.

C) Durchführung (Demonstration)

- a) Die beiden Standard-Proben werden im ³H- bzw. ¹⁴C-Diskriminator jeweils 5 Minuten gezählt.
- b) Die Meßergebnisse werden in die unter **D) Auswertung** vorbereitete Tabelle zur Bestimmung der Zählausbeute eingetragen.

D) Auswertung

- a) Zunächst ist zwischen Zählrate und Zerfallsrate (=Radioaktivität) zu unterscheiden. Die Zählrate (IpM oder CpM = Impulse/Min. oder Counts per Min.) ist nicht gleichzusetzen mit der Zerfallsrate (DpM = Disintegrations per Min. oder Zerfälle/Min.) eines Radionuklids (s.S. 136 ff). Erst durch Kenntnis mehrerer Kenngrößen, vor allem der Zählausbeute, kann die Zerfallsrate aus der Zählrate bestimmt werden (s.u.).
- b) Die Zählausbeute eines Gerätes zur Messung der Radioaktivität errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Zählausbeute (in \%)} = \frac{\text{IpM (Standard)} \cdot 100}{\text{DpM (Standard)}}$$

Da die Zerfallsrate der Standard-Proben (DpM) bekannt ist, muß nur die Zählrate (IpM) der beiden Proben bestimmt werden.

- c) Während die Halbwertszeit, also die Zeit, nach der die Hälfte aller Kerne eines Radionuklids zerfallen ist, bei ¹⁴C **5760 Jahre** beträgt, muß die Radioaktivität des ¹⁴C-Standards nicht korrigiert werden. Allerdings erfordert der ³H-Standard eine Halbwertszeit-Korrektur.

Die Halbwertszeit von ³H beträgt 12.26 Jahre. Das Standard-Präparat wurde am 20. 10. 1973 mit einer Zerfallsrate von 98700 DpM beschafft.

Die Halbwertszeit-Korrektur wird nach dem Zerfallsgesetz vorgenommen. Es lautet: Die Anzahl radioaktiver Kerne zum jetzigen Zeitpunkt (N_t) ist die Anzahl an zu Anfang vorliegenden Kernen (N₀), multipliziert mit der Exponentialfunktion aus ln(2) / Halbwertszeit • Zwischenzeit nach folgender Formel:

$$N_t = N_0 \cdot e^{(-\ln(2) / T \cdot t)}$$

$$N_t = 98700 \cdot e^{(-0.6932 / 4474.9 \cdot t)}$$

Dabei bedeuten:

N_t = Heutige Zerfallsrate;

N_0 = Zerfallsrate am 20.10. 1973 = 98700 DpM;

T = 12.26 Jahre = 4474.9 Tage;

t = Zeit zwischen dem 20. 10. 1973 und heute;

t = Tage).

Die Zerfallsrate des ^3H -Standards beträgt also DpM.

d) Somit kann dieser Versuch nach folgender Tabelle ausgewertet werden:

Radionuklid	E_{max}	Zerfallsrate Standard (in DpM)	Zählrate Standard (in IpM)	Ausbeute (in %)
^3H	0.018 MeV
^{14}C	0.156 MeV	102300

e) Ist die Ausbeute für ein Radionuklid bestimmt, kann aus der Messung der Zählrate (IpM) die Zerfallsrate von Proben des gleichen Nuklids, selbstverständlich unter den gleichen Meßbedingungen (Anteil Probe im Scintillator-Cocktail etc.), nach folgender Formel berechnet werden:

$$\underline{\text{Zerfallsrate Probe (DpM)}} = \frac{\text{IpM (Probe)} \cdot 100}{\% \text{ Ausbeute}}$$

E) Literatur

ALLKOFER, O.C. (1971): Teilchen-Detektoren.
Thiemig-KG, München.

COOPER, T.G. (1981): Biochemische Arbeitsmethoden.
W. de Gruyter, Berlin.

6. Arbeitstag:

Auswertung von Position bzw. Höhe der Radioaktivität markierter Verbindungen in Dünnschicht- oder Papierchromatogrammen und/oder Elektropherogrammen.

Versuchsziel: Einführung in die Arbeitsweise eines TLC-Radioaktivitätsscanners.

A) Prinzip

Oft besteht in einem biochemischen Labor die Notwendigkeit, Ort und Intensität radioaktiver Strahlung auf Dünnschicht- oder Papier-Chromatogrammen oder auf Flachgel-Elektropherogrammen zu messen. Dies erfolgt z.T. immer noch über die sogenannte Autoradiografie.

Dieses Verfahren beruht darauf, daß ein Chromatogramm, ein Elektropherogramm mit einer Trennung radioaktiv markierter Substanzen oder auch eine radioaktiv markierte, getrocknete Pflanze (flächiges Objekt!) mit einem Röntgenfilm in einem lichtdichten, mit Blei abgeschirmten Kasten, z.T. bei sehr niedriger Temperatur, in Kontakt gebracht, exponiert wird. Je nach der Energie des zur Markierung verwendeten Radionuklids dauert dieser Prozeß etwa 2 bis 6 Wochen. Der Röntgenfilm zeigt nach seiner Entwicklung an Stellen des Präparates mit Radioaktivität Schwärzungen, die proportional der Intensität der Strahlung sind.

Die Autoradiografie wird vornehmlich zum Nachweis von (α - und) β -Radionukliden in Anbetracht ihrer relativ hohen Ionisationsdichte verwendet. Sie ist vorallem dann sehr wertvoll, wenn man eine gute Ortsauflösung der Radioaktivitätsverteilung anstrebt. Allerdings ist sie nur mit einem optischen "Densitometer" im Hinblick auf die Intensitätsmessung der Schwärzungs-Verteilung des Röntgenfilms quantitativ auszuwerten.

In Anbetracht der langen Zeitdauer bis zum Vorliegen eines Autoradiogramms hat man seit einiger Zeit Geräte entwickelt, welche flächige Objekte zur Messung ihrer Radioaktivitäts-Verteilung an Zählrohren schrittweise oder mäanderförmig vorbeibewegen, die sogenannten "Radio(aktivitäts)scanner". Hierzu wird z.B. eine Dünnschichtplatte auf einem in X- und Y-Richtung motorisch steuerbaren Tisch befestigt. Die während des Scannens am Detektor anliegenden Signale werden auf Laborschreiber oder Integratoren protokolliert.

Neue Geräte arbeiten mit ortsempfindlichen Gas-Durchfluß-Proportional-Zählrohren, die auf einer Bahn eines Chromatogramms alle radioaktiven Ereignisse messen können. Die Signale des Zählrohrs werden in einem Computer Bahn für Bahn abgespeichert und können mittels speziellem Programm zu einer flächigen Darstellung am

Bildschirm (oder Drucker) gelangen. Nach diesem Prinzip arbeitet auch das uns zur Verfügung stehende Gerät.

Zunächst ist zu erklären, wie ein Gas-Durchfluß-Proportional-Zählrohr arbeitet. Das Zählrohr wird mit einem leicht zu ionisierenden Gas (hier 10% Methan, 90 % Argon) kontinuierlich durchströmt. Die angelegte Hochspannung bewirkt das Arbeiten im sogenannten Proportionalbereich der Zählrohr-Charakteristik (s. Abb. 16.1, aus: „Kern- und Strahlentechnik“, Lehrbriefe der Studiengemeinschaft Darmstadt). Das bedeutet, daß die Amplitude des Zählrohrsignals streng proportional der Energie der einfallenden radioaktiven Strahlung ist. Es ist also auch möglich, obwohl in der Praxis eher selten erforderlich, auf einer Meßplatte unterschiedliche Radionuklide nachzuweisen. Das Zählrohr ist an seiner Unterseite offen, so daß auch schwachenergetische (α - oder) β -Strahlung zu erfassen ist.

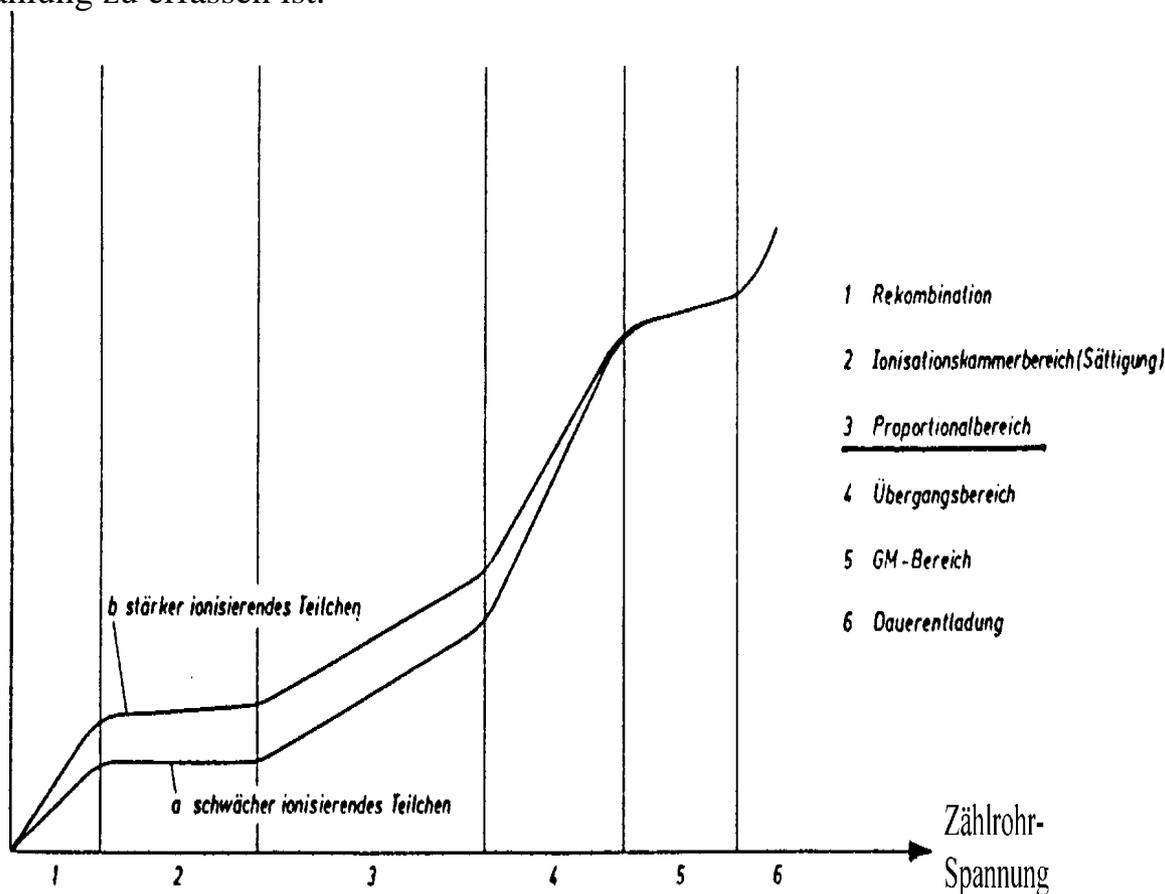


Abb. 16.1: *Ionisationsstrom in Abhängigkeit von der anliegenden Spannung eines Ionisationsdetektors*

Die ortsempfindliche Arbeitsweise des Zählrohrs wird dadurch erreicht, daß im Zählrohr ein positiv geladener Anodendraht und einige Kathodendrähte in Längsrichtung (ca. 20 cm) gespannt sind. Tritt nun durch das an seiner Unterseite offene, mit unterschiedlichen Schlitzblenden versehene Zählrohr radioaktive Strahlung ein, wird das

ständig nachgeführte Zählgas (Methan, Argon, s.o.) ionisiert. Die dabei freigesetzten Elektronen werden zum Anodendraht hin stark beschleunigt und erreichen ihn an der Stelle der Aussendung der radioaktiven Strahlung. Im Anodendraht entsteht ein Elektronenstrom, dessen Laufzeit bis zur nachgeschalteten Elektronik proportional ist dem Ort des Eintritts der Radioaktivitätsstrahlung. In einem Zeitanalysator werden diese Laufzeit-Unterschiede gemessen und zur Ortsbestimmung der Radioaktivitäts-Verteilung ausgewertet (s. **Abb. 16.2**).

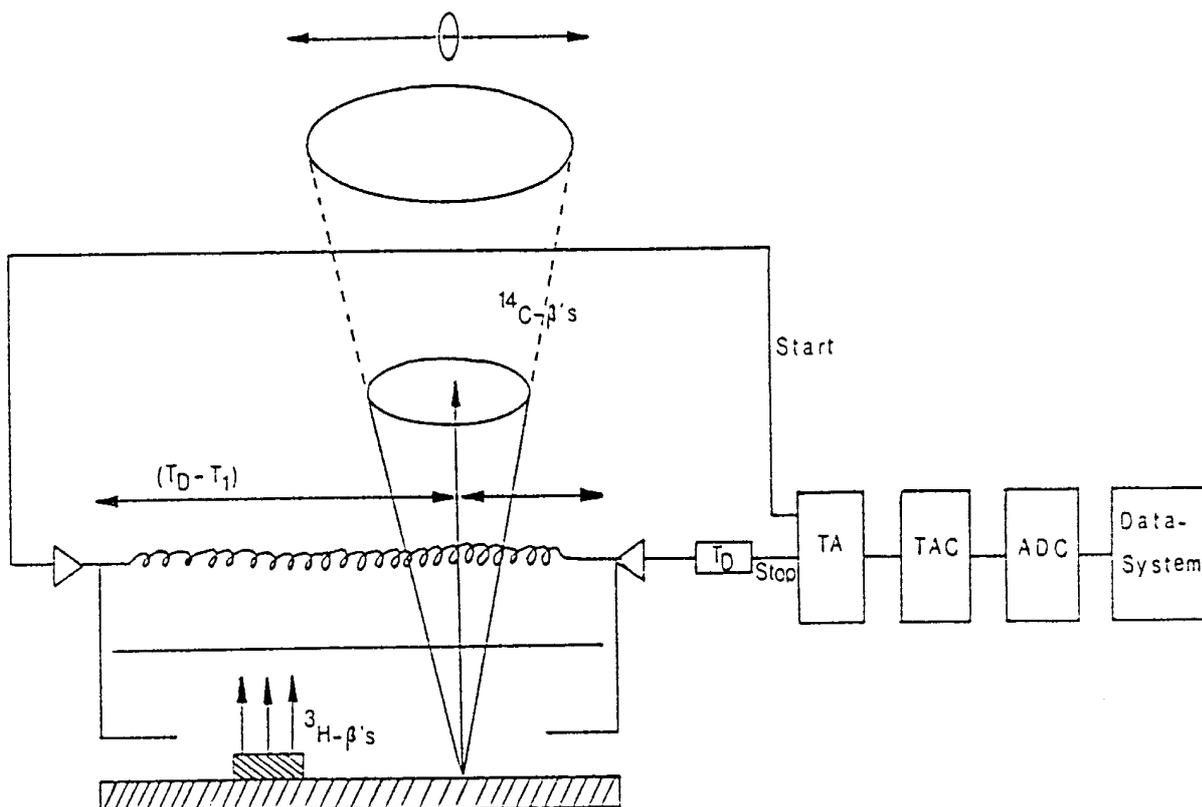


Abb. 16.2: Prinzip des ortsempfindlichen Proportionalzählrohrs
(Betriebsanleitung BERTHOLD)

TA = Zeit-Analysator;
TAC = Zeit-Amplituden-Converter;
ADC = Analog-Digital-Converter:

Über Optionen des steuernden Programms ist es alternativ möglich, eine bessere Ortsauflösung auf Kosten der Meßempfindlichkeit des Scanners zu wählen. Nach Vorgabe der Zeit für die Messung einer Chromatografie-Bahn steuert ein Tisch-Vorschub die nächste zu messende Bahn am Chromatogramm an u.s.w., bis das gesamte Chromatogramm gemessen ist. Mit Hilfe des Programms kann eine zweidimensionale Darstellung der gemessenen Signale mit Farbcodierung der gemessenen Intensität der radioaktiven Strahlung auf dem Bildschirm dargestellt

werden. Auch eine dreidimensionale Darstellung der Radioaktivitäts-Verteilung des gemessenen Chromatogramms ist möglich.

Durch Integration der gemessenen Radioaktivität in einzelnen Bereichen ist eine quantitative Auswertung der Radioaktivitäts-Verteilung möglich. Ein Report wird bei Bedarf auf einem angeschlossenen Drucker ausgegeben.

Je nach der Energie des zu messenden Radionuklids dauert ein Scannprozeß etwa 5-32 Stunden, wobei die Signalaufnahme automatisch ohne Interaktion mit einer Person abläuft. Im Vergleich zur **Autoradiografie** ist demnach eine gewichtige Zeitverkürzung und gleichzeitig eine quantitative Auswertung zu erreichen.

Zur Demonstration der Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens werden im Praktikum einige Beispiele vorgestellt.

B) Material und Geräte

- a) Simuliertes Papierchromatogramm: An drei Stellen entlang einer Bahn in der Mitte eines Chromatografie-Papiers wurde rote Tinte, die mit $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ stark markiert ist, in Mengen von 10, 15 und 20 μl aufgetragen;
- b) Zählgas P10 (10% Methan, 90% Argon) in Stahlflasche mit Reduzier-Ventil;
- c) TLC-Scanner (Linear Analyzer LB 285, Firma Berthold) und Computer mit Steuerungs- und Auswertungs-Programm.

C) Durchführung (Demonstration)

- a) Das "Papierchromatogramm" ist auf dem Meßtisch befestigt. Zur Vermeidung von Strahlungsbelastung wird die Abdeckklappe des Geräts immer geschlossen gehalten.
- b) Nach Einschalten des Geräts wird Meßgas mit einer in einem Durchflußmeßgerät ablesbaren Flußrate durch das Proportional-Zählrohr geleitet.
- c) Nach Eingabe des Start- und Endpunkts der Messung auf der Y-Achse des Chromatogramms (angebrachte cm-Skala) wird die Messung gestartet. Das Zählrohr ist auf einem Hebearm befestigt, der vor und nach jeder Bahn-Messung das Zählrohr vor der Bewegung zur nächsten Bahn hochfährt, damit das zu messende Chromatogramm nicht beschädigt wird.

- d) Während der Messung sind auf dem Computer-Bildschirm die einzelnen Bahnergebnisse ortsrichtig und farbcodiert zur Angabe der gemessenen Intensität der radioaktiven Strahlung abgebildet.
- e) Nach Ende der Messung kann zunächst eine Untergrund-Korrektur vorgenommen werden. Danach werden die Stellen am Bildschirm mit ausgewiesener Radioaktivität markiert, entweder mittels Ellipse oder Rechteck, wonach die einzelnen Flecken integriert werden können. Dabei kann es von Vorteil sein, nur bestimmte Teile der Gesamtbildes auf dem Bildschirm darzustellen.
- f) Die Ergebnisse der Integration einzelner Flecken (in IpM) sind in die unter **D) Auswertung** vorbereitete Tabelle einzutragen.

D) Auswertung

- a) Zur Einschätzung der Auflösung des TLC-Scanners wurde ein aliquoter Teil der radioaktiv markierten Tinte auch im LSC gemessen. 20µl wiesen eine Zerfallsrate von 559845 DpM auf.
- b) Zur Auswertung die Integrationsergebnisse in folgende Tabelle eintragen und im Vergleich zur LSC-Messung die Ausbeute im Proportional-Zählrohr für ¹⁴C errechnen:

Tinten-fleck Nr.	Volumen Tinte (µl)	Zerfalls-rate (LSC) (DpM)	Zähl-rate (IpM)	Errechnete Ausbeute (%)
1	10
2	15
3	20	559845
Mittlere Ausbeute:				<u>.....</u>

6. Arbeitstag:

Identifizierung und Radioaktivitäts-Bestimmung von γ -Nukliden in Nahrungsmitteln (z.B. getrocknete Pilze, Nüsse, Milchpulver, Tee etc.) mit einem Na(Tl)J- γ -Spektrometer.

Versuchsziel: Einführung in die Arbeitsweise eines γ -Spektrometers mit Vielkanal-Meßvorrichtung.

A) Prinzip

Die γ -Spektrometrie mit Na(Tl)J-Kristall-Scintillations-Zählrohren ist auch heute noch eine probate Methode zur Identifizierung von Nukliden mit γ -Strahlung und zur Bestimmung ihrer Strahlungsintensität, obgleich der Einsatz moderner hochreiner, im Betrieb aber teurer (Kühlung mit flüssigem Stickstoff!) Halbleiter-Detektoren in Bezug auf ihre Meßeempfindlichkeit nicht übertroffen werden können. Sind z.B. in Nahrungsmitteln nur relativ wenige γ -Nuklide zu identifizieren, z.B. in der Situation nach Tschernobyl, sind Na(Tl)J-Kristall-Scintillations-Detektoren für diese Zwecke noch durchaus einsetzbar.

Die von Nukliden ausgesendete γ -Strahlung trifft zunächst auf den Kristall des Scintillations-Zählrohrs, meist ein mit etwa 1% Tantal (Tl) dotierter NaJ-Kristall (Na(Tl)J). Die Absorption der γ -Quanten infolge **Photo-**, **Compton-** und **Paarbildungs-Effekt** führt zu einer Anregung von Kristall-Molekülen und als Folge zu einer Aussendung von Lichtquanten. Das emittierte Licht wird, ähnlich wie bei der LSC-Messung, an der Photokathode von Photomultipliern (PM) oder Sekundär-Elektronen-Vervielfachern (SEV) (s.S. 149) in Photoelektronen umgesetzt (**s. Abb. 17.1**). Der Elektronenstrom wird als Impuls in der nachgeschalteten Elektronik weiterverarbeitet und zur Anzeige gebracht. Dabei ist festzuhalten, daß die Amplitude der im SEV erzeugten Impulse streng proportional ist der Energie der einfallenden γ -Strahlung, so daß eine Nuklid-Identifikation über sogenannte Impulshöhen-Analysatoren vorgenommen werden kann. Die Arbeit mit Impulshöhen-Analysatoren (**s. Abb. 17.2**) ist sehr zeitaufwendig. Das zur Selektion einzelner Impuls-Amplituden einzustellende "Fenster" ist jeweils spezifisch zu setzen und die Anzahl der zugehörigen Impulse am Meßgerät abzulesen. Ein Energiespektrum ergibt sich somit aus vielen einzelnen Meßpunkten (**s. Abb. 17.3**).

-

Abb. 17.1: Aufbau eines Na(Tl)J-Kristall-Scintillations-Detektors

(aus: Petzold W. u. H. Krieger (1988): Strahlenphysik, Dosimetrie und Strahlenschutz; Bd. 1; B. G. Teubner, Stuttgart)

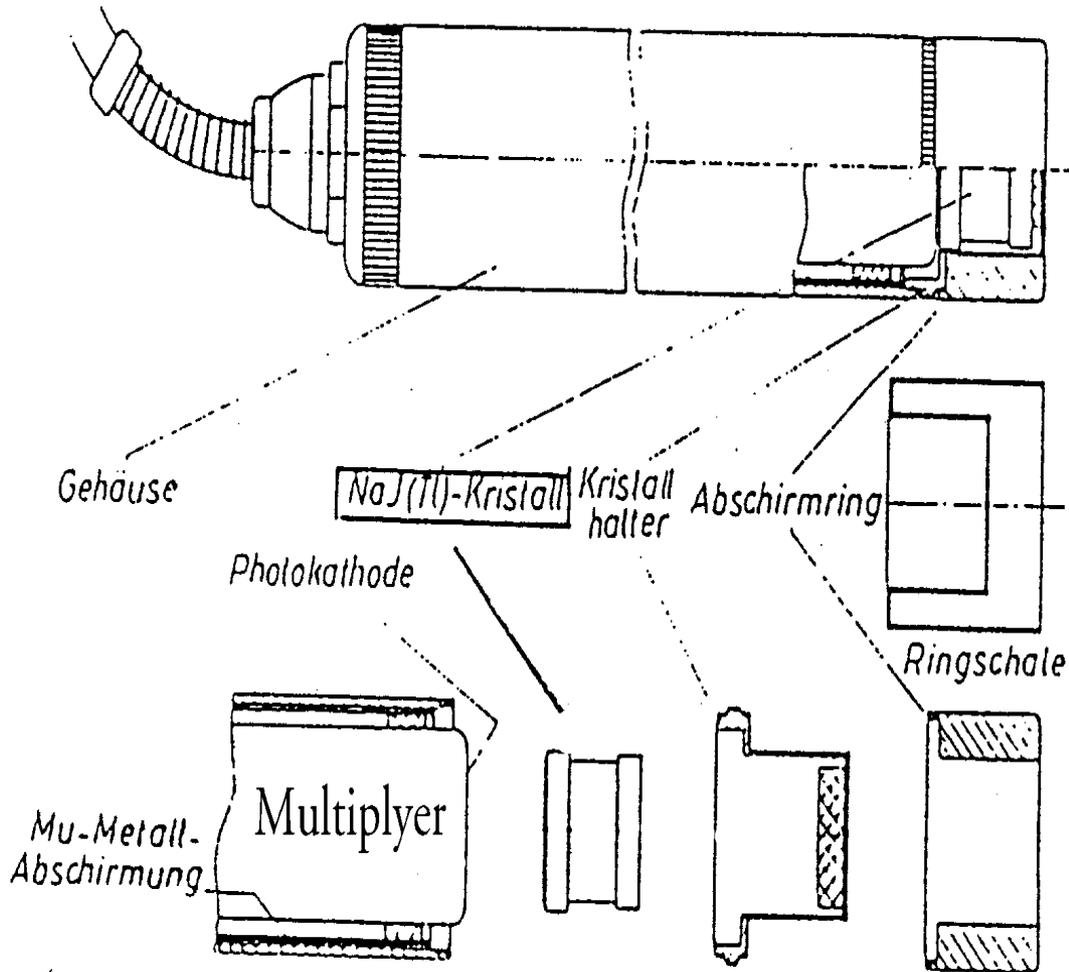


Abb. 17.1 (Fortsetzung): Aufbau eines Na(Tl)J-Kristall-Scintillations-Detektors
 (aus: „Kern- und Strahlentechnik“, Lehrbriefe der Studiengemeinschaft Darmstadt)

SEV (Multipliyer)

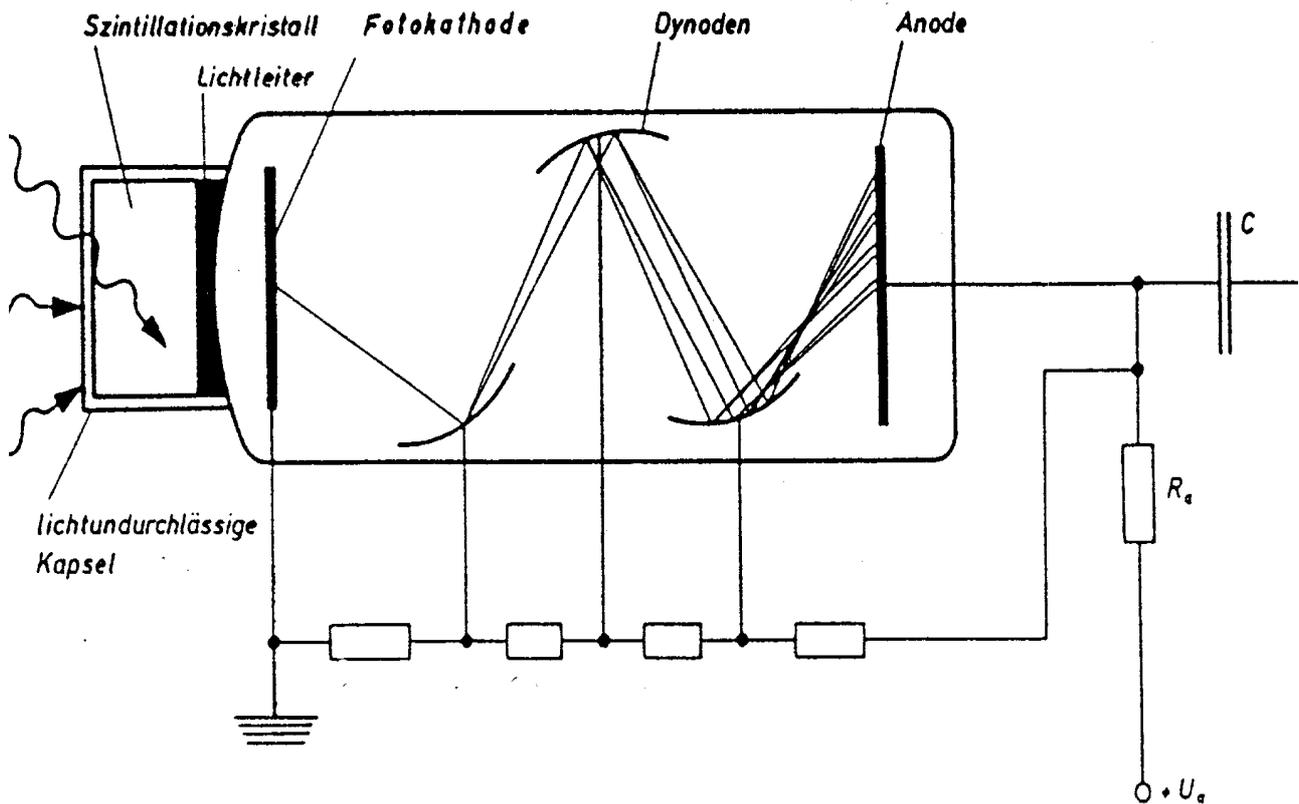


Abb. 17.2: Aufbau eines Meßplatzes zur Impulshöhen-Analyse (γ -Spektroskopie)

(aus: Petzold W. u. H. Krieger (1988): Strahlenphysik, Dosimetrie und Strahlenschutz; Bd. 1; B. G. Teubner, Stuttgart)

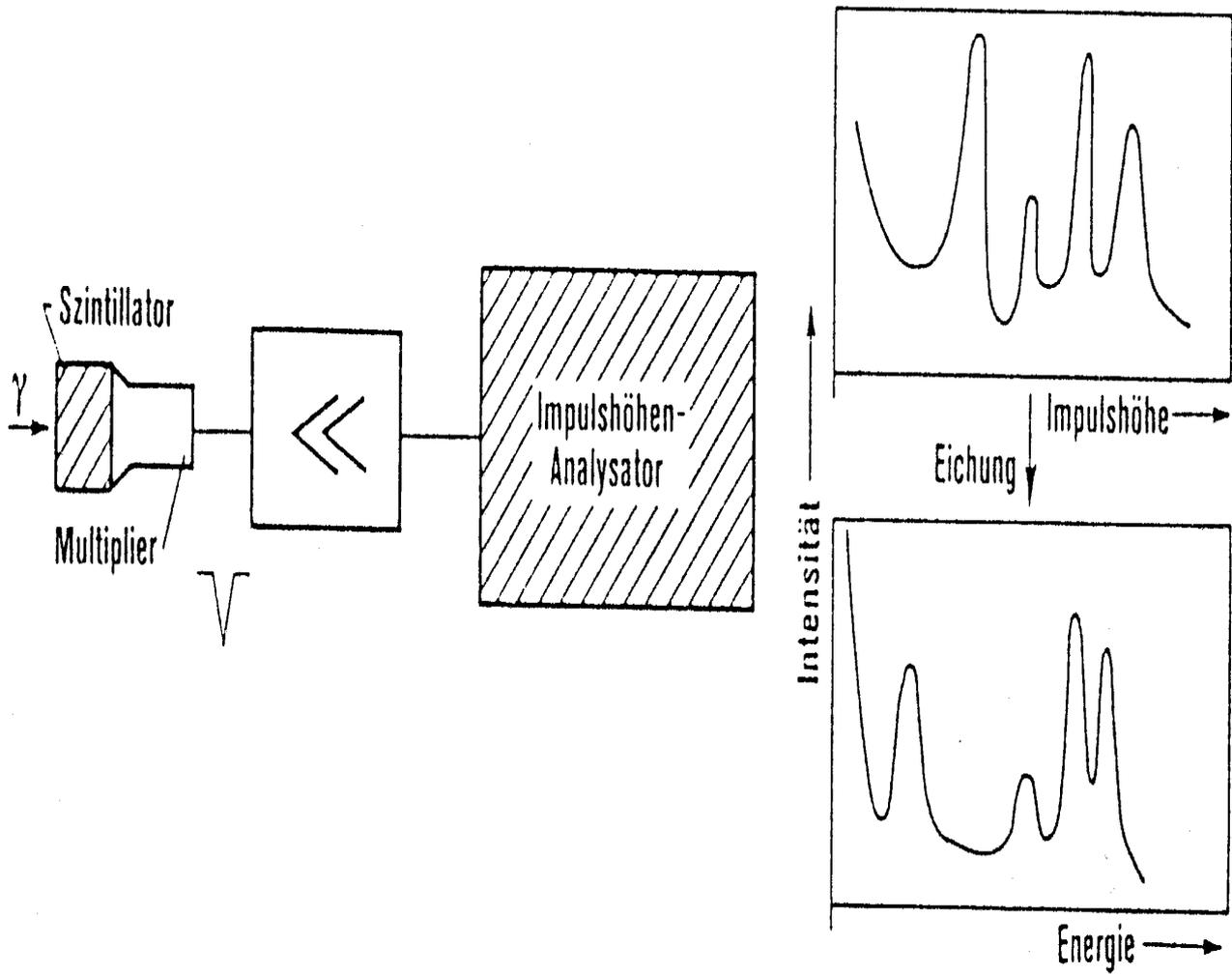
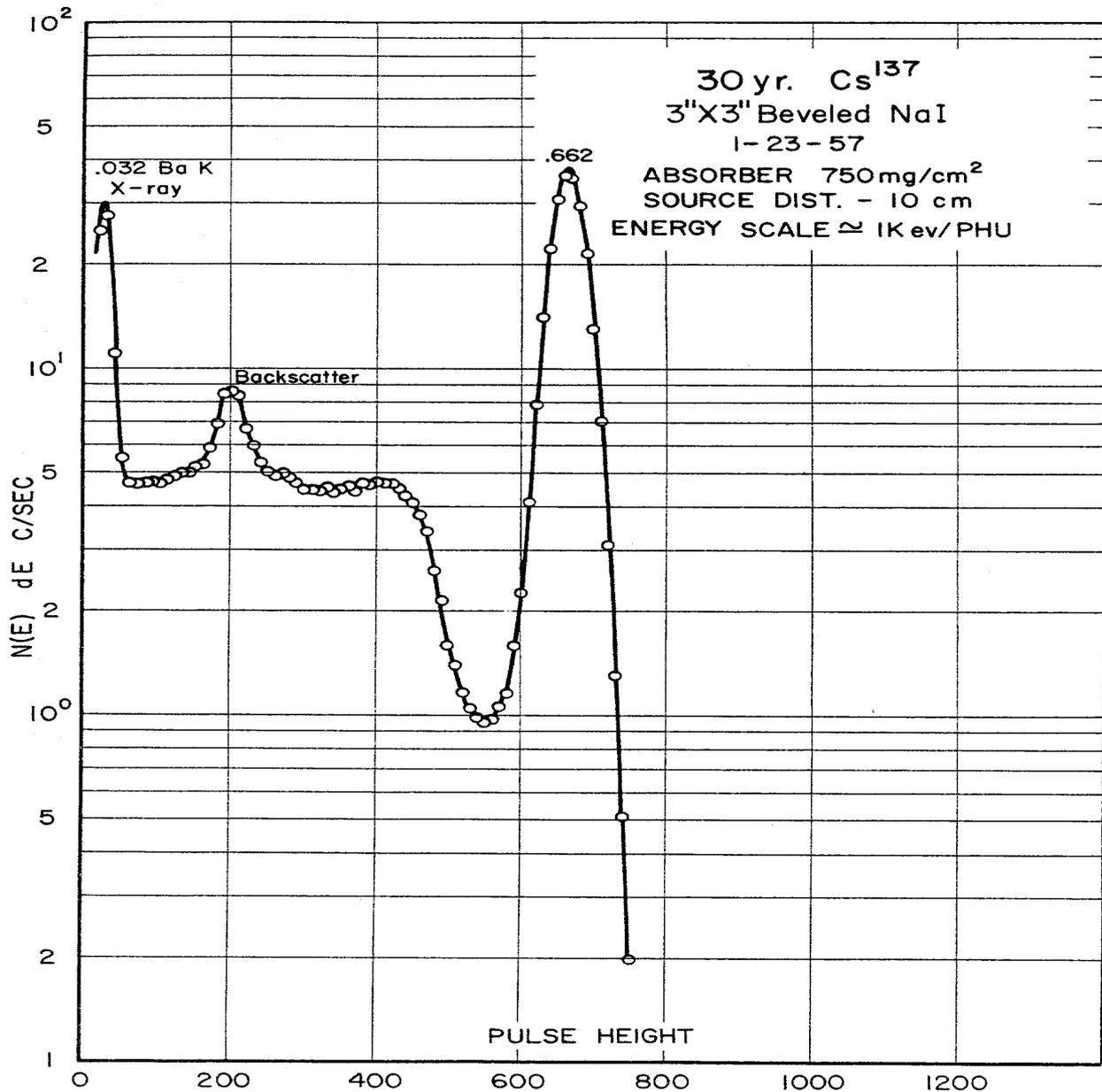


Abb. 17.3: Energiespektrum von ^{137}Cs als Beispiel für ein punktwise erstelltes Impulshöhen-Diagramm

(aus: Petzold W. u. H. Krieger (1988): Strahlenphysik, Dosimetrie und Strahlenschutz; Bd. 1; B. G. Teubner, Stuttgart9

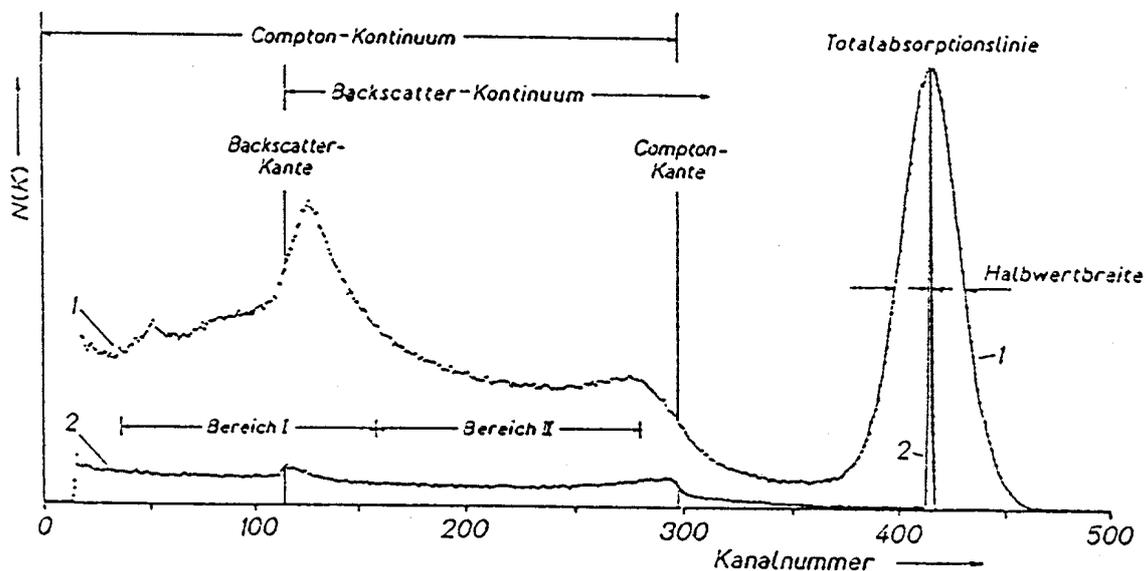


Neuere Geräte arbeiten sehr viel weniger zeitaufwendig mit der sogenannten "Vielkanal"-Methode zur Impulshöhen-Analyse. Hierzu werden die Impulse vom SEV (s.S. 149), zunächst linear verstärkt, einem Analog-Digital-Wandler (ADC) zugeführt, in digitale Signale umgeformt und je nach deren Größe in entsprechend codierte Speicher eingelesen und dort aufsummiert. Die Summe der einzelnen Speicherzellen kann auf dem Bildschirm in einem XY-Diagramm (auf der Ordinate die Impuls-Summen, auf der Abszisse die Nummern der Speicherkanäle, nach Eichung direkt auch die Nuklid-Energie) ausgegeben werden.

Hierzu ein Beispiel:

Ein vom SEV abgegebener, verstärkter Spannungsimpuls gelangt an den Analog-Digital-Converter. Die Impuls-Amplitude ergibt eine Digitalzahl von 100. Über das Auswerte-Programm wird die Speicherzelle 100 angesprochen und deren Inhalt um 1 erhöht. Ein anderer Impuls mit einem Digitalwert von 50 gelangt in die Speicherzelle 50 und erhöht deren Inhalt um 1, u.s.w. (**s. Abb. 17.4** - Diese Abbildung zeigt im Vergleich zu Abb. 17.3 gleichzeitig die mit einem Na(Tl)J- und Halbleiter-Detektor aufgenommenen Energie-Spektren von ^{137}Cs). Während einer Messung ist das Auffüllen der Speicher-Kanäle (Anzahl Impulse auf der Ordinate) in Abhängigkeit ihrer Speicher-Adresse (auf der Abszisse) zu beobachten.

Abb. 17.4: Impulshöhen-Spektren für ^{137}Cs (aus: Petzold u. Krieger, 1988)



Impulshöhenspektren für monoenergetische Photonenstrahlung (Cs-137 , $E_{\text{ph}} = 661,6 \text{ keV}$). Nullpunkt der Abszisse $2,95 \text{ keV}$, Energiegleichung $1,59 \text{ keV/Kanal}$.

Photolinie $661,6 \text{ keV}$ (Kanal 414), Compton-Kante $477,7 \text{ keV}$ (Kanal 298), Backscatter-Kante $184,3 \text{ keV}$ (Kanal 114).

Bereich I: Impulshöhenbereich für die Schwächungsmessungen Fig. 6.12, Kurven 4 (50 keV bis 250 keV),

Bereich II: Impulshöhenbereich für die Schwächungsmessungen Fig. 6.12, Kurven 3 (250 keV bis 450 keV).

Kurve 1: Szintillationszähler, NaJ(Tl), $38,1 \text{ mm } \varnothing \times 25,4 \text{ mm}$, Be-Fenster $0,2 \text{ mm}$. Relative Halbwertbreite Γ/\bar{H} der Totalabsorptionslinie $8,1\%$. 25% der Impulse liegen in der Totalabsorptionslinie, 75% im Compton-Kontinuum.

Kurve 2: Ge(Li)-Halbleiterdetektor, planar, aktive Fläche 3 cm^2 , aktive Dicke 12 mm , Al-Fenster $0,5 \text{ mm}$, Sperrschicht $500 \mu\text{m}$ Germanium. Relative Halbwertbreite Γ/\bar{H} der Totalabsorptionslinie $0,4\%$. 8% der Impulse liegen in der Totalabsorptionslinie, 92% im Compton-Kontinuum.

Unser Gerät verfügt über einen ADC, der die Impuls-Amplituden in etwa 1000 einzelne Digitalwerte umwandelt, und über etwa 1000 einzelner Speicherzellen. Bei Halbleiter-Detektoren verwendet man meist sogar etwa 5000 oder 8000 einzelner Energie-Kanäle.

Beispiele zur Identifizierung und Messung von ^{134}Cs , ^{137}Cs , und ^{40}K enthaltenden Proben werden im Verlauf der Demonstration gezeigt.

B) Material und Geräte

- a) Nahrungsmittel-Proben, die nach Tschernobyl noch β -Radionuklide enthalten könnten. **Die Studenten können eigene Proben zur Verfügung stellen.**
- b) KCl-Probe zur Messung der natürlichen Radioaktivität von ^{40}K ;
- c) Kristall-Scintillations-Zähler, 2x2 Zoll NaJ(Tl), mit Bleiabschirmung und Proben-Gefäßen;
- d) Vorverstärker und Vielkanal-Analysator (Berthold-Ortec), Computer und Drucker.

C) Durchführung

- a) Bis zum Ende dieses Praktikumstages (nach Absprache auch an weiteren Tagen außerhalb dieses Praktikums) können Ihre Proben gemessen werden.
- b) Die Probe wird zunächst in eine sogenannte "Marinelli"-Schale gefüllt, deren Form der Oberfläche des Kristall-Scintillations-Zählers gut angepaßt ist. Danach das Steuer- und Auswerte-Programm am Computer laden und starten.
- c) Auf dem Bildschirm erscheint in XY-Darstellung die Energie-Achse (X) und die Ordinate für die gemessene Anzahl der zugehörigen Impuls-Amplituden. Beide Achsen können unterschiedlich skaliert werden. Jeder Punkt der sich ergebenden Darstellung des Energiespektrums auf dem Bildschirm entspricht dabei dem Inhalt einer Speicherzelle.
- d) Während der Messung kann am Bildschirm mitverfolgt werden, wie sich die Impulszahl in den einzelnen Speicherzellen verändert. Schließlich ergibt sich ein Energiespektrum der vorliegenden γ -Nuklide. Je nach deren Intensität ist eine genügend lange Zeit erforderlich, bis sich eine klare Darstellung einzelner "Photopeaks" ergibt.

- e) Nach dem Prozeß der Datenaufnahme erfolgt die Identifikation einzelner Regionen des erhaltenen Spektrums anhand von Standard-Werten, die in Bibliotheks-Daten abgelegt sind. Es besteht auch die Möglichkeit, das Meßspektrum mit dem Spektrum von Eichmessungen auf dem Bildschirm zu überlagern und direkt zu vergleichen.
- d) Entweder am Bildschirm oder auf dem Drucker sind die in einzelnen Speicher-(Energie-)Kanälen angesammelten Impulssummen als Impulse pro Zeiteinheit auszugeben. Über Standard-Werte in den Bibliotheks-Daten des Rechners sind die Zählraten einzelner Spektrumsbereiche direkt in die Aktivität der entsprechenden Radionuklide (Bequerel pro Gramm Substanz oder pro Substanz-Volumen) umzurechnen. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß die zu messende Probe die Beschaffenheit (Dichte, spezifisches Gewicht etc.) von Standardproben aufweisen sollte, um die Proben-Aktivität in Bq/g oder Bq/ml angeben zu können.

D) Auswertung

- a) Studenten, die eigene Proben mitgebracht hatten, bekommen die ausgedruckten Ergebnisse der Messungen ausgehändigt.
- b) Die übrigen Studenten fügen ihrem Protokollheft eine Kopie der Ergebnisse der ^{40}K -Messung in 400g KCl-Salz bei.
- c) Aus der Zählrate der KCl-Probe (IpM) ermittle man nach den in folgender Anmerkung aufgeführten Angaben die Ausbeute der ^{40}K -Messung mittels γ -Spektrometrie.

Hierzu einige Anmerkungen:

Jedes Kalium-Salz enthält pro Gramm Kalium 0.118 mg ^{40}K . Dies führt zur Emission von 3.5 γ -Quanten/Sek. pro Gramm Kalium. Die Energie der Gammastrahlung von ^{40}K beträgt 1.460 MeV.

400g KCl enthalten g Kalium:

Atomgewicht (K) = 39.100

Molekulargewicht (KCl) = 74.557

1 Gramm Kalium emittiert 3.5 γ -Quanten pro Sekunde,
insgesamt sollten demnach von 400g KCl

..... γ -Quanten pro Sekunde emittiert werden.

Die Impulssumme des Photopeaks von 400g KCl beträgt nach

..... Sekunden Meßzeit (Impulse).

Dies entspricht einer Zählrate von IpS.

Die Ausbeute für die ^{40}K -Messung beträgt somit: (%).

E) Literatur

Petzold W. u. H. Krieger (1988): Strahlenphysik, Dosimetrie und Strahlenschutz; Bd. 1; B. G. Teubner, Stuttgart

III) Versuche zu gentechnischen Verfahren **Seite**
Versuchs- und Zeitplan

1. Arbeitstag	173
18.1 Gewinnung von Zellsuspensionen	175
18.1.1 Sterilisation von Karottensamen	175
18.1.2 Kulturbedingungen	175
18.1.3 Nährmedium	175
19.1 Bakterienvermehrung	177
19.2 Herstellung kompetenter Zellen des Bakterienstamms <i>E. coli</i> HB101	177
19.3 Transformation des Bakterienstamms HB101 mit Plasmid pPCV812	178
19.4 Ausplattieren transformierter Bakterien und Selektion transformierter Klone	180
2. Arbeitstag	183
19.5 Plasmidvermehrung	185
19.6 "Kleine" Plasmid-Präparation (Mini-prep)	185
19.6.1 Reinigung von Plasmid-DNA	185
19.6.2 Fällung der DNA mit Isopropanol	186
19.7 Quantitative und qualitative Bestimmung des DNA-Gehaltes	186
19.8 Agarose - Gelelektrophorese	187
19.9 Färbung der DNA mit Ethidiumbromid	187
3. Arbeitstag	189
20.1 Identifizierung des Plasmids pPCV 812	191
20.2 Konjugation	191
4. Arbeitstag	195
20.3 Konjugation des <i>E. coli</i> -Stammes S 17-1 (enthält Plasmid 812) mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , Stamm GV3101pMP90 RK	197
5. Arbeitstag	199
21.1 Transformation pflanzlicher Zellen	200
21.2 Methoden der Genübertragung	201
21.3 Vitalitätstest der Karottenzellen	202
21.4 Co-Kultur von <i>A. tum.</i> mit Pflanzenzellen	202

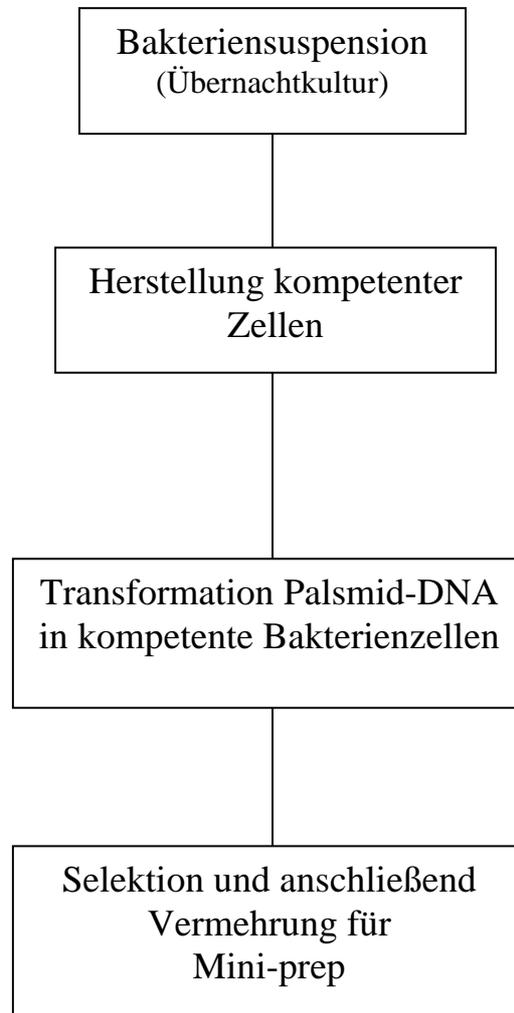
6. Arbeitstag	205
22.1 Nachweis des eingebauten Gens	206
22.2 Der Einsatz von Farbstoffen (X-Gluc)	206
7. Arbeitstag	209
22.3 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	210
22.3.1 Prinzip der PCR-Methode	210
22.3.2 PCR-Reaktionsansatz	212
22.3.3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte	214
22.4 Extraktion pflanzlicher DNA	214
22.4.1 CTAB-Preparation pflanzlicher Gesamt-DNA	214
8. Arbeitstag	219
22.5 Spaltung genomischer DNA	220
22.6 Southern-Verfahren	220
22.6.1 Gelbehandlung	221
22.6.2 Blotaufbau	221
22.6.3 Kovalente Bindung der DNA an Membranen	222
22.7 Herstellung der Sonde	222
22.1.1 Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Gel	223
22.7.2 Radioaktive Markierung der Sonde	224
22.7.3 Abtrennung der freien Nukleotide	226
22.8 Prähybridisierung	226
22.9 Hybridisierung	228
22.9.1 Waschen der Membranen	228
22.10 Autoradiographie	228
Literatur	231
Anhang	235

1. Arbeitstag

Übersicht zur Genübertragung und zum Genübertragungsnachweis in Pflanzenzellen

Versuch 18	Gewinnung von Zellsuspensionen
Versuch 19	Transformation in <i>E. coli</i> zur Plasmidvermehrung <div style="background-color: #e0e0e0; padding: 5px; margin: 5px 0;"> Selektion Vermehrung </div> DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 20	Konjugation Transformation in <i>E. coli</i> zur Konjugation Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + <i>E. coli</i>) Selektion DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 21	Transformation Pfl. Zellen Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + Pflanzenzellen) Selektion
Versuch 22	Nachweis des Fremdgens GUS mit X-Gluc } Blaufärbung PCR Southern-Verfahren

Transformation in *E. coli* zur Plasmidvermehrung



18.1 Gewinnung von Zellsuspensionen

Zur Erstellung transgener Pflanzen ist es sinnvoll, Pflanzenmaterial zu nehmen, das sich nach der Kultur zu Pflanzen regenerieren lässt. Karotten sind als Modellpflanze gut geeignet, weil man über die somatische Embryogenese eine große Anzahl von Pflanzen erstellen kann (mehr dazu, Neumann 1995)

18.1.1 Oberflächensterilisation von Karottensamen

Etwa vier Wochen vor Versuchsbeginn werden die Karottensamen sterilisiert. Hierzu werden sie 1 Min. mit 70%igem Ethanol und anschließend ca. 1,5 bis 2 Stunden unter Rühren mit einem Magnetrührer mit einer 1:1,5 verdünnten Natrium-Hypochloritlösung (ca. 7 % aktives Chlor) und einem Tropfen Tween 80 behandelt. Unter sterilen Bedingungen wird der Samen nach mehrmals mit sterilem Aqua dest. gewaschen und auf B₅- Nährmedium mit 0,4 %ige Gelrite + 0,5 ppm 2,4-D ausgelegt. Die Kultivierung erfolgt für ca. 4 Wochen, dann wird der am Hypokotyl des Keimling gebildete Kallus in flüssiges B₅-Medium zur Erstellung von Suspensionskulturen überführt. Zur Erhaltung der Kulturen werden sie alle 2 Wochen in B₅- Nährmedium subkultiviert.

18.1.2 Kulturbedingungen

Die in vitro-Kultur erfolgt bei 28 °C und einer Dauerbelichtung mit ca. 4000 Lux (Osram, Lumilux white).

Als Kulturgefäße für die Agarkulturen dienen handelsübliche "Babynahrungsgläser" und Einmachgläser, die mit 50 ml bzw. 100 ml Medium befüllt werden.

18.1.3 Nährmedium

Die Zusammensetzung des Nährmediums ist folgender Übersicht zu entnehmen.

Das Nährmedium wird vollständig angesetzt und dann der pH-Wert mit Hilfe von HCl bzw. NaOH auf 5,7 eingestellt. Die anschließende Sterilisation des Nährmediums und anderer Flüssigkeiten erfolgt durch Autoklavieren bei 121 °C und 1,1 bar für 30 Min. Glassachen und Bestecke werden im Trockenschrank bei 150 °C für 4 Stunden sterilisiert.

Die verwendeten Stammlösungen zum Ansatz der Nährmedien haben folgende Zusammensetzung:

Stammlösung B5 (Gamborg et al., 1968)* ad 1 l Aqua dest.:

a) Makroelemente:

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	1,50 g
KNO ₃	30,00g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,34g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,50g

b) Mikroelemente:

MnSO ₄ · 7H ₂ O	100,00 mg
H ₃ BO ₄ · H ₂ O	30,00 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	20,00 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2,50 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25 mg
KJ	7,50 mg

Fe-Lösung ad 1 l Aqua dest.:

Fe-EDTA	4,63g
---------	-------

Mg-Lösung ad 1 l Aqua dest.:

MgSO ₄ · 7H ₂ O	36,00g
---------------------------------------	--------

Vitaminlösung ad 100 ml Aqua dest.:

Nikotinsäure	50,00 mg
Thiamin	10,00 mg
Pyridoxin	10,00 mg

Hormonlösungen jeweils ad 100 ml Aqua dest.:

myo-Inosit	500,00 mg
2,4-D	10,00 mg (in ca. 1 ml abs. Ethanol vor lösen)

* Nährlösung nach Gamborg et al., (1968), modifiziert nach Schäfer et al., (1988)

**Zusammensetzung des gebrauchfertigen Nährmediums:
(Angaben für 1 l):**

Saccharose (g)	20
Caseinhydrolysat (mg)	250
Stammlösung (B5) (ml)	100
Fe-Lösung (ml)	10
Mg-Lösung (ml)	1
Vitamin-Lösung (ml)	1
Inosit-Lösung (ml)	10
2,4-D-Lösung (ml)	5
Gelrite (g)	4

pH-Wert auf 5,7 einstellen

19.1 Bakterienvermehrung

Hierzu wird ein Abstrich eines in glycerinhaltigem Medium bei -80 °C aufbewahrten Bakterienstamms (hier *Escherichia coli* Stamm HB101) mit einer Impföse entnommen und in 5 ml LB-Medium (s. 19.4) ohne Antibiotikum übertragen. Diese Kultur läßt man über Nacht (sog. Übernachtskultur) ca. 16 Stunden wachsen, und zwar bei 37 °C unter ständigem Schütteln (200 Upm). Am nächsten Morgen wird diese Kultur für eine Plasmidaufnahme kompetent gemacht.

**19.2 Herstellung kompetenter Zellen des Bakterienstammes
E. coli HB101**

Die Übernachtskultur wird in 100-200 ml vorgewärmtes (37 °C) LB-Medium überführt und 1-2 Stunden weiter kultiviert. Durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm verfolgt man das Bakterienwachstum. Für die Transformationseffizienz ist es entscheidend, daß sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Deshalb wird das Bakterienwachstum bei einer OD₆₀₀ von 0,2 abgebrochen. Die Kultur wird sofort auf Eis gekühlt (ca. 10 Min.). Dann werden die Bakterien in zwei Falkontuben aufgeteilt, anschließend bei 4000-5000 Upm für 10 Min. abzentrifugiert. Es wird sofort dekantiert und das Sediment in 1,5 ml eiskalter 100 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert, anschließend 15-20 Min. auf Eis inkubiert.

Dieser und alle folgenden Schritte sollten unbedingt auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt werden.

Es wird sofort bei 4 °C für 10 Min. bei 4000-5000 Upm (Kühlzentrifuge, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abdekantiert und das Sediment in 0.5 ml 100 mM MgCl₂- Lösung resuspendiert. Die Suspension wird dann für 10-20 Min. auf Eis abgestellt. Die Zellen sind jetzt kompetent und können für Transformationen verwendet werden.

Kompetente Zellen können einige Tage auf Eis oder einige Monate im Glycerinmedium gelagert werden.

19.3 Transformation des Bakterienstammes HB101 *E. coli* mit dem Plasmid pPCV812 (s. Abb. 18.1)

Der Vorgang der Transformation ist die Aufnahme externer Plasmid-DNA durch entsprechend kompetente Bakterienstämme.

Zu 50-100 µl der kompetenten Bakteriensuspension (s. 18.3) werden 100-200 ng Plasmid-DNA gegeben. Um eine Adsorption der DNA an die Bakterien zu ermöglichen, wird die Mischung für 15 Min. auf Eis inkubiert. Dann erfolgt ein Wärmeschock von 5 Min. bei 37 °C, wodurch die adsorbierte Plasmid-DNA aufgenommen wird. Der Vorgang wird noch einmal wiederholt.

Eine Zugabe von LB-Medium und 1-stündiges Schütteln der Mischung bei 37 °C fördern das Wachstum der transformierten Bakterien und Synthese von β -Lactamase gegen Ampicillin. Nach diesem Zeitraum können die Bakterien auf einem entsprechenden Nährboden (LB-Medium + Amp₁₀₀) ausplattiert werden.

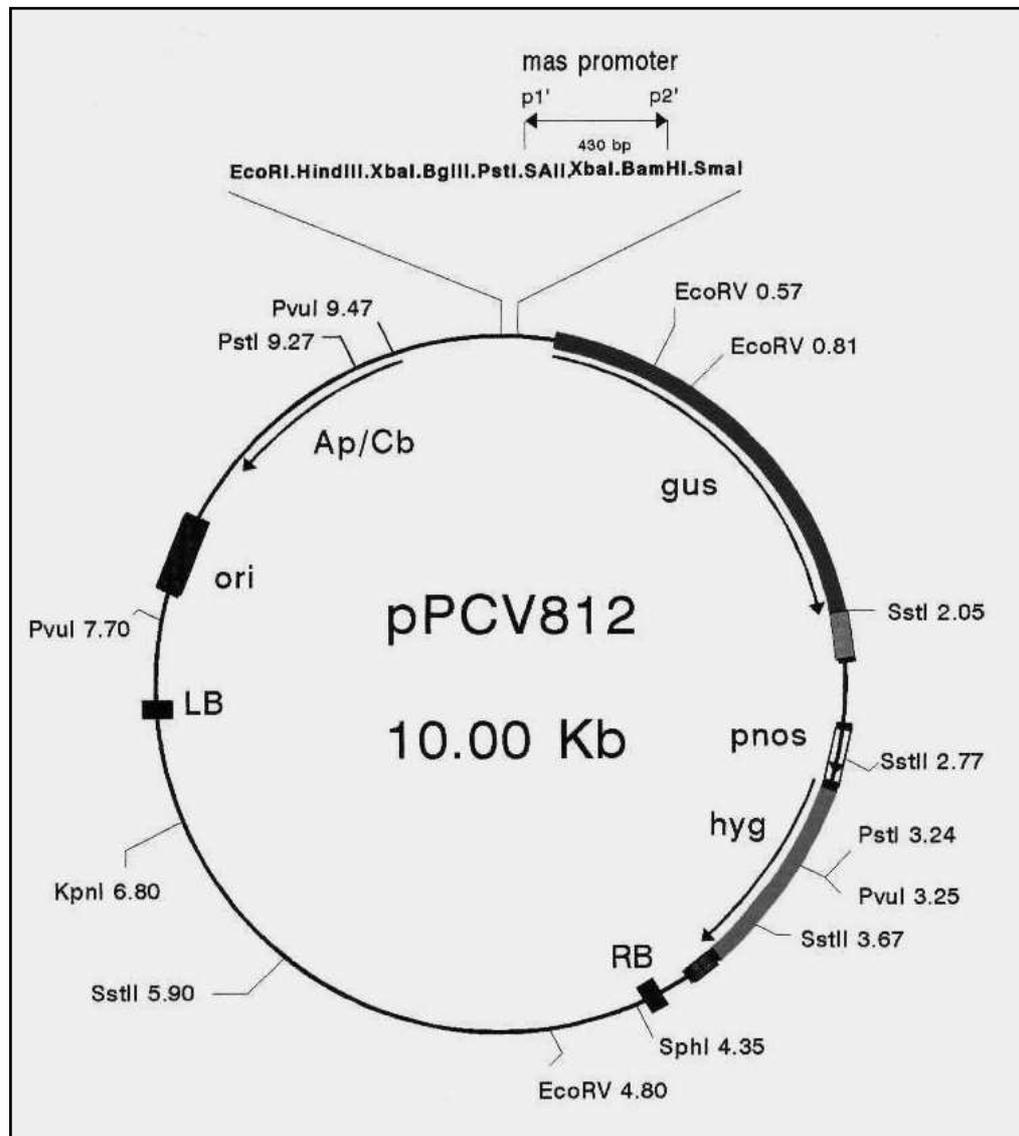


Abbildung 18.1 : Plasmidkarte von pPCV812. (Das Plasmid wurde uns freundlicherweise von Dr. Koncz, MPI-Köln zur Verfügung gestellt):

mas →Mannopinsynthase

gus →Glucuronidase

hyg →Hygromycin

Ap/Cb →Ampicillin/Carbenicillin

19.4 Ausplattieren transformierter Bakterien (*E. coli*, Stamm HB101) und Selektion transformierter Klone

a) Ausplattieren transformierter Bakterien

Hierbei geht man von der Bakterienmischung aus, die nach der Transformation im LB-Medium vorliegt. Ein Aliquot, 30, 50, 100 µl der Suspension wird auf einer Nähragarplatte (LB-Medium + 100 mg/l Ampicillin) ausplattiert. Ist die Lösung getrocknet, werden die Agarplatten für 12-16 Stunden in einem Brutraum bei 37 °C inkubiert.

b) Selektion transformierter Bakterien

Bakterien, die nicht transformiert wurden, d.h. keine Plasmid-DNA aufgenommen haben, müssen ausselektiert werden. Deshalb bedient man sich des Bakterienstammes HB101, der gegen das Antibiotikum Ampicillin empfindlich ist. Wurde mit einem Plasmid transformiert, welches eine Ampicillinresistenz trägt, sind nur diese Bakterien in der Lage, auf Nährböden zu wachsen, die dieses Antibiotikum enthalten.

Nährmedien: 1 Liter

Luria-Berta-Medium (LB-Medium)

Caseinhydrolysat (Pepton)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Bacto Agar	15 g

autoklavieren

YEB-Medium

Fleischextrakt	5 g	
Hefeextrakt	1 g	
Caseinhydrolysat (Pepton)	5 g	
Saccharose	5 g	
Bacto Agar	20 g	
1 M MgCl ₂ *		2 ml

pH auf 7,2 einstellen, autoklavieren, auf 45 °C abkühlen, anschließend dazu 2 ml steriles 1M MgCl₂ pipettieren.

* Sterilisation erfolgt mit Rotrandfilter (0,2 µm)

AntibiotikaStammlösung:

Ampicillin	25 mg/ml	steril filtrieren*
Carbenicillin	25 mg/ml	steril filtrieren*

bei -20 °C aufbewahren

Glycerinmedium

75 µl Bakteriensuspension
25 µl Glycerin (autoklaviert)

gut mischen, anschließend in flüssigem Stickstoff schockfrieren und bei -80 °C aufbewahren.

Bakterien können unter diesen Bedingungen einige Jahre ohne Vitalitätsverlust gelagert werden.

* Sterilisation erfolgt mit Rotrandfilter (0,2 µm)

2. Arbeitstag

Übersicht zur Genübertragung und zum Genübertragungsnachweis in Pflanzenzellen

Versuch 18 **Gewinnung von Zellsuspensionen**
Sterilisation von Samen

Versuch 19 **Transformation in *E. coli* zur Plasmidvermehrung**
Selektion
Vermehrung

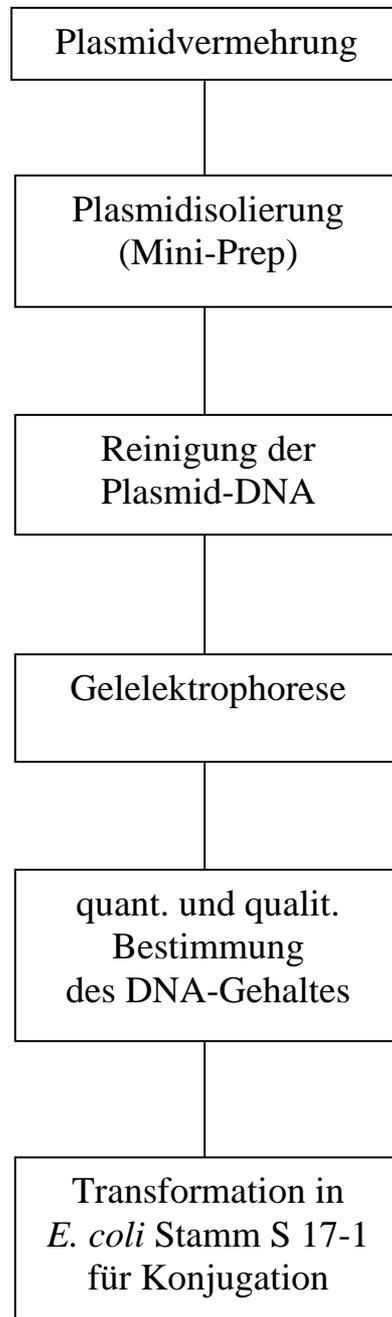
DNA-Präparation
DNA-Identifizierung

Versuch 20 **Konjugation**
Transformation in *E. coli* zur Konjugation
Co-Kultur (*A. tum.* + *E. coli*)
Selektion
DNA-Präparation
DNA-Identifizierung

Versuch 21 **Transformation Pfl. Zellen**
Co-Kultur (*A. tum.* + Pflanzenzellen)
Selektion

Versuch 22 **Nachweis des Fremdgens**
GUS mit X-Gluc } Blaufärbung
PCR
Southern-Verfahren

Transformation in *E. coli* zur Plasmidvermehrung



19.5 Plasmidvermehrung

Hierzu wird ein Bakterienkolonie von einer entsprechenden Agarplatte (s. 1. Praktikumstag) mit einer Impföse entnommen und in 5 ml LB-Medium + Ampicillin übertragen (vom Betreuer durchgeführt). Diese Kultur läßt man über Nacht (sog. Übernachtskultur) ca. 16 Stunden aufwachsen.

19.6 "Kleine" Plasmid-Präparation (Mini-prep)

Am nächsten Morgen werden ca. 1,5 ml der Übernachtskultur in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, auf Eis gekühlt und anschließend 10 Min. bei 5000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig entfernt. Jetzt wird zu dem Sediment 100 µl Lösung I (s. 19.9) gegeben und gut resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II (s. 19.9) werden die Bakterienzellen für einige Minuten bei Raumtemperatur lysiert, anschließend werden 180 µl von der Lösung III (s. 19.9) zugegeben und 5 Min. auf Eis inkubiert, damit erreicht man eine Ausfällung der Proteine.

Nach der Inkubation wird 10 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand (Plasmid im Überstand) wird in ein autoklaviertes Eppendorfreaktionsgefäß zur Reinigung aufgenommen.

19.6.1 Reinigung von Plasmid-DNA

1) RNase-Behandlung

Die RNA-haltige Plasmidpräparation, welche aus der alkalischen Lysis gewonnen wurde, wird mit 5 µl RNase versetzt. Die Inkubation erfolgt für 30 Min. bei 37 °C im Wasserbad.

2) Proteinase K-Behandlung

Diese Behandlung kann dann nötig sein, wenn Proteine sehr fest an die DNA gebunden sind.

Proteinase K wird in einer Konzentration von 0,05 mg/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgt für 30 Min. bei 37 °C.

3) Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA!!!

Um störende Proteine, die bei der DNA-Aufbereitung ausgefällt werden (auch RNase- und Proteinase-Reste), zu entfernen, wird die DNA-haltige Lösung mit einem gleichen Volumen Extraktionsphenol!!! (Tris-Puffer gesättigtes Phenol, unter dem Abzug) versetzt und heftig gemischt. Die Phasen trennen sich binnen 5 Min. Dann schüttelt man erneut aus. In einer Zentrifuge bei Raumtemperatur können die Phasen bei 13000 Upm während 3-5 Min. getrennt werden. Die wässrige Phase wird in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit einem entsprechenden Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) gemischt und ausgeschüttelt, anschließend bei 13000 Upm für 3 Min. zentrifugiert. Danach wird die obere Phase in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol gefällt.

19.6.2 Fällung der DNA mit Isopropanol

Zur Erhöhung der Konzentration muß die DNA nach der Reinigung gefällt und in kleineren Volumen aufgenommen werden. Zu der DNA-Lösung wird 1/10 des Volumens 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 6,0) und 2/3 (v/v) Isopropanol gegeben. Die Mischung wird gut geschüttelt und einige Minuten auf Eis gelegt. Danach wird die DNA mittels Zentrifugation sedimentiert (15 Min. bei 13000 Upm). Nach Trocknung in TE-Puffer pH 7,6 oder in autoklaviertem bidest. Wasser lösen, anschließend die Konzentration bestimmen und bei -18°C lagern.

19.7 Quantitative und qualitative Bestimmung des DNA-Gehaltes

Um eine quantitative wie qualitative Einschätzung des DNA-Gehaltes in der Lösung vornehmen zu können, wird ein Aliquot der Lösung auf 1/100 verdünnt. Dann wird die Absorptionsmessung in Quarzküvetten im Spektralphotometer durchgeführt. Die Menge an Rein-DNA ist direkt proportional der optischen Dichte (OD) der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine OD (260 nm) von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Um die Qualität der DNA bestimmen zu können, wird eine vergleichende Messung bei 280 nm durchgeführt. Der Quotient der Messung bei 260 und 280 nm sollte bei einer sauberen DNA-Präparation bei 1,8 liegen. Liegt der Quotient bei 2,0, so ist die DNA mit RNA verunreinigt. Liegt er unter 1,8,

so ist die Präparation mit Phenol oder Proteinen kontaminiert. Es ist ratsam, nach der Ermittlung der DNA-Konzentration mittels Photometer, die tatsächliche Menge über ein Agarosegel zu überprüfen. Eine λ -DNA-Konzentrationsreihe (5, 10, 20 und 30 ng [λ -Phagen-DNA]) dient als Standard zur Ermittlung der DNA-Konzentration. Die Nachweisgrenze bei dieser Methode liegt bei etwa 5 ng DNA-Menge.

19.8 Agarose-Gelelektrophorese (s. auch S. 91-118)

Die Gele dienen der Untersuchung von DNA-Fragmenten oder von Plasmiden nach einem Präparationsschritt bzw. nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen. Hierfür wird in der Regel ein 1% Agarosegel gegossen. Dazu wird die Agarose unter Erhitzung in dem Laufpuffer des Gels (1x TBE-Puffer, s. u.) gelöst, und ca. 50 °C heiß in die Elektrophoresekammer eingefüllt. Die Minigelkammer nimmt ca. 10 μ l Probe auf. Diese sollte vorher mit einem Indikator versetzt worden sein (etwa 1/5 der Probe), z.B. Bromphenolblau zum Anzeigen der Laufmittelfront.

19.9 Färbung der DNA mit Ethidiumbromid

Um die DNA auf dem präparativen Analysengel sichtbar zu machen, werden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 μ g/ml in Wasser) für ca. 5-15 Min. gefärbt. Im Praktikum wird 5 μ l Ethidiumbromid-Lösung zu dem Gel vor dem Giessen gegeben. Das Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren und leuchtet bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm). Mit Hilfe eines Transilluminators und einer Sofortbildkamera (Polaroid) kann die Verteilung der DNA auf dem Gel photographisch festgehalten werden.

Lösung I

50 mM Glucose
25 mM Tris, pH 8,0
10 mM EDTA
mit bidest. Wasser auffüllen;
autoklavieren

Lösung II

0,2 N NaOH
1% (w/v) SDS
mit bidest. Wasser auffüllen

Lösung III

5 M K-Acetat 60%
Eisessig 11,5 %
mit bidest. Wasser auffüllen

RNase A-Stammlösung

10 mg/ml
in 10 mM Tris.HCl pH 7,5 und 15 mM NaCl lösen

Proteinase K-Stammlösung

20 mg/ml

TE-Puffer

10 mM Tris, pH 8,0
1 mM EDTA

TBE-Puffer (10x)

100 mM Tris-Base
100 mM Borsäure
2,5 mM EDTA

Ethidiumbromid (!!! giftig !!!)

10 mg/ml Stammlösung

Na-Acetat-Lösung

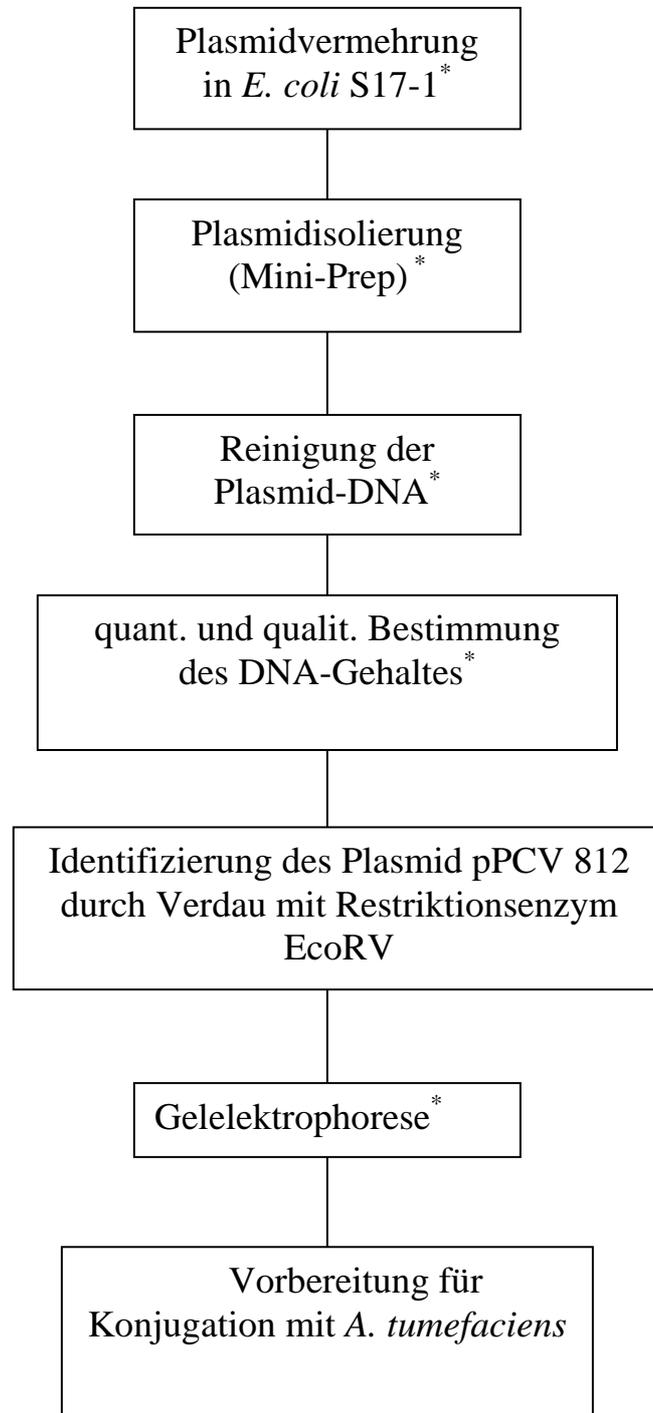
3 M Na-Acetat pH 6,0 (mit Essigsäure einstellen)

3. Arbeitstag

Übersicht zur Genübertragung und zum Genübertragungsnachweis in Pflanzenzellen

Versuch 18	Gewinnung von Zellsuspensionen Sterilisation von Samen
Versuch 19	Transformation in <i>E. coli</i> zur Plasmidvermehrung Selektion Vermehrung DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 20	Konjugation Transformation in <i>E. coli</i> zur Konjugation Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + <i>E. coli</i>) Selektion DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 21	Transformation Pfl. Zellen Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + Pflanzenzellen) Selektion
Versuch 22	Nachweis des Fremdgens GUS mit X-Gluc } Blaufärbung PCR Southern-Verfahren

Transformation in *E. coli* zur Konjugation



* siehe 2. Praktikumstag

20.1 Identifizierung des Plasmids pPCV 812

Um die Identität eines Plasmids zu überprüfen, sollte man es mit entsprechenden Endonucleasen (Restriktionsenzyme) verdauen (schneiden). Hier ist zu berücksichtigen, daß sich noch eine erhebliche Menge an RNA in der Plasmidpräparation befinden kann. Daher wird zum Restriktionsenzymverdau simultan ein Abbau der RNA mittels zugesetzter RNase A durchgeführt. Auch stören Verunreinigungen (Proteine, Phenol etc.), so daß die verwendete Menge an Restriktionsenzym relativ hoch ist. Im Praktikum wird das Plasmid pPCV 812 durch das Enzym EcoRV (dieses Enzym schneidet das Plasmid an 3 Stellen) verdaut.

Reaktionsansatz:

DNA-Lösung (0,5-1,0 mg)	10	µl
10x TBE-Puffer	2	µl
Enzym (EcoRV 5-10 u)	0,5	µl
bidest. Wasser	7,5	µl
	<u>20</u>	<u>µl</u>

1-1,5 Stunden bei 37 °C inkubieren

Nach der Inkubation wird die Probe auf 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Größe der Schnitte (Banden) sollen ca. 240, 4000 und 6200 Basenpaaren sein (s. Plasmidkarte Abb.18.1).

20.2 Konjugation

Die Übertragung von genetischem Material (DNA) durch direkten Kontakt von Zelle zu Zelle nennt man Konjugation. Die Genübertragung durch Konjugation wurde an *Escherichia coli* entdeckt. Genaustausch durch Konjugation und Mobilisierung von Genen durch Plasmide sind im Reich der Prokaryonten sehr weit verbreitet. Die konjugative Übertragung des Binärvektors von *Escherichia coli* in *Agrobacterium tumefaciens*- erfolgt durch die Methode der triparentalen Paarung nach VAN HAUTE et al. (1983).

Im Praktikum ist der *E. coli*-Stamm S 17-1 Spender (Donor) und *A. tumefaciens* Empfänger (Recipient). Dieser Stamm besitzt neben dem chromosomalen Streptomycinresistenzgen, die Mob- und Tra-Funktion (SIMON 1984), die bei Konjugation eine Übertragung des Plasmids in andere Bakterien durchführt.

Der *Agrobacterium*-Stamm GV3101 (pMP90RK) ist Standardwirt des pPCV Plasmids (plant cloning vector). Dieser Stamm hat ein chromosomales Markergen, das für Rifampicinresistenz codiert (VAN LAREBEKE et al. 1977 und KONCZ et al. 1990) und einen Träger pMP90RK, ein Helferplasmid, das neben einem Kanamycin-Resistenzgen die Virulenzfunktion für den Transfer der T-DNS von *Agrobacterium* in Pflanzenzellen hat (mehr dazu s. im Internet, <http://www.gbf-braunschweig.de/> unter DSM No.: 7490 bei DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

Der *Agrobacterium*-Stamm GV3101 (pMP90RK) wird bei 28°C vermehrt. Nach der Inkubation im Nährmedium mit Ampicillin und Rifampicin werden *A. tum.* - Kolonien, die das Plasmid aufgenommen haben, selektiert.

Das Plasmid von *E. coli* S 17-1 ist darüber hinaus besser für die Konjugation mit *A. tum.* geeignet, für die Vermehrung der Plasmiden ist dagegen der *E. coli*-Stamm HB101 besser verwendbar (höhere Ausbeute). Darum wird die Vermehrung der Plasmid-DNA zunächst mit letzterem durchgeführt.

Die Übertragung des aus dem HB101 isolierten Plasmides pPCV812 auf den Stamm S 17-1 folgt dem weiter oben beschriebenen Verfahren für HB101 (s. 1. und 2. Arbeitstag)

Heutige Verfahren zum Gentransfer:

a) Direkter Gentransfer:

- Protoplasten (Zelle ohne Zellwand, nackte Zelle)
 - Polyethylenglykol (PEG)
 - Elektroporation

- Partikelbeschuss-Technik

b) Indirekter Gentransfer:

- *Agrobacterium tumefaciens* (**das im Praktikum verwendete Verfahren**)

Parasexualität

Prokaryonten verfügen generell über keine echte Sexualität, weil das typische Fehlen eines Zellkerns weder Meiose noch Karyogamie gestattet.

Ein Austausch genetischen Materials ohne einer Meiose-/Karyogamieabfolge, also über Parasexualität, spielt bei Prokaryonten eine ganz erhebliche Rolle und wird von Gentechnikern gezielt benutzt.

Die prokaryontische Parasexualität erfolgt nach folgenden Mechanismen:

1. (genetische) Transformation
2. Transfektion
3. Transduktion (Konjugation)

Auf dem Donorplasmid von *E. coli* und dem Rezeptorplasmid von *A. tum.* müssen homologe Bereiche als Voraussetzung für die Rekombination und Co-Integration der manipulierten DNA (aus *E. coli*) in das Ti - Plasmid (Rezeptorplasmid von *A. tum.*) existieren.

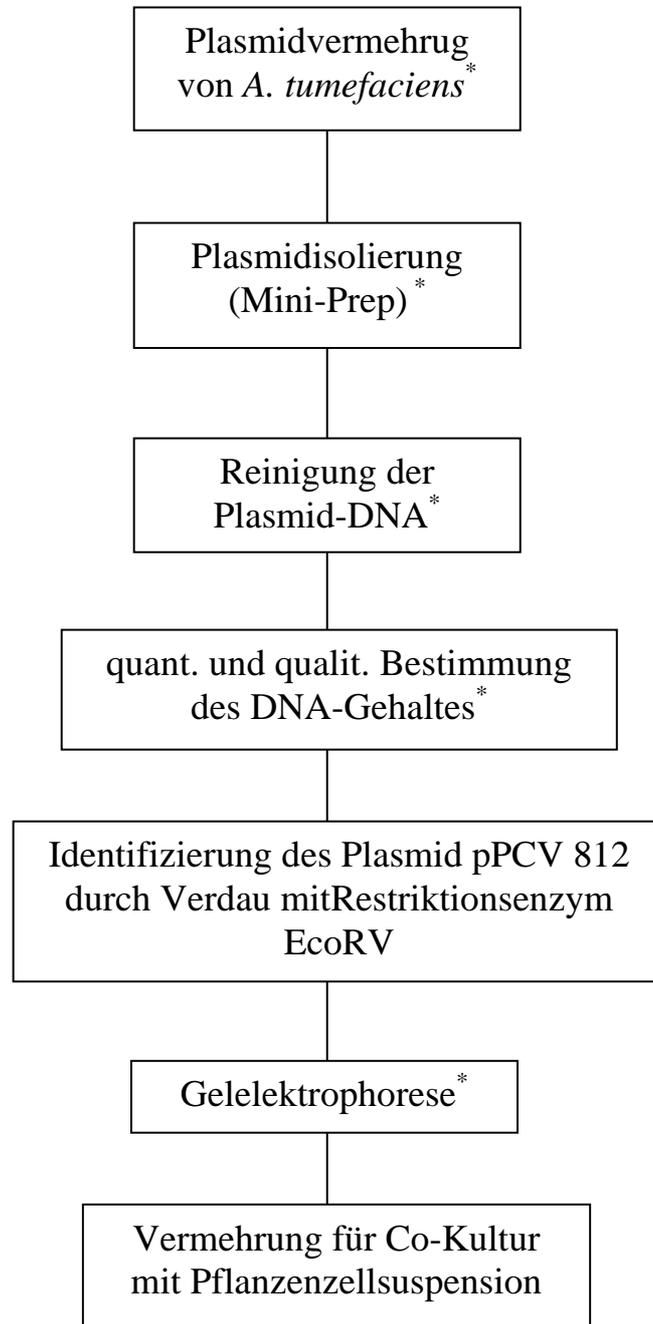
E. coli als Donor besitzt ein Plasmid (sog. Helferplasmid) mit Transfer (tra+)- und Mobilisierungs (mob+)- Eigenschaften, die den Transfer des gewünschten Plasmidabschnittes in *A. tum.* ermöglicht.

4. Arbeitstag

Übersicht zur Genübertragung und zum Genübertragungsnachweis in Pflanzenzellen

Versuch 18	Gewinnung von Zellsuspensionen Sterilisation von Samen
Versuch 19	Transformation in <i>E. coli</i> zur Plasmidvermehrung Selektion Vermehrung DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 20	Konjugation Transformation in <i>E. coli</i> zur Konjugation Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + <i>E. coli</i>) Selektion DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 21	Transformation Pfl. Zellen Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + Pflanzenzellen) Selektion
Versuch 22	Nachweis des Fremdgens GUS mit X-Gluc } Blaufärbung PCR Southern-Verfahren

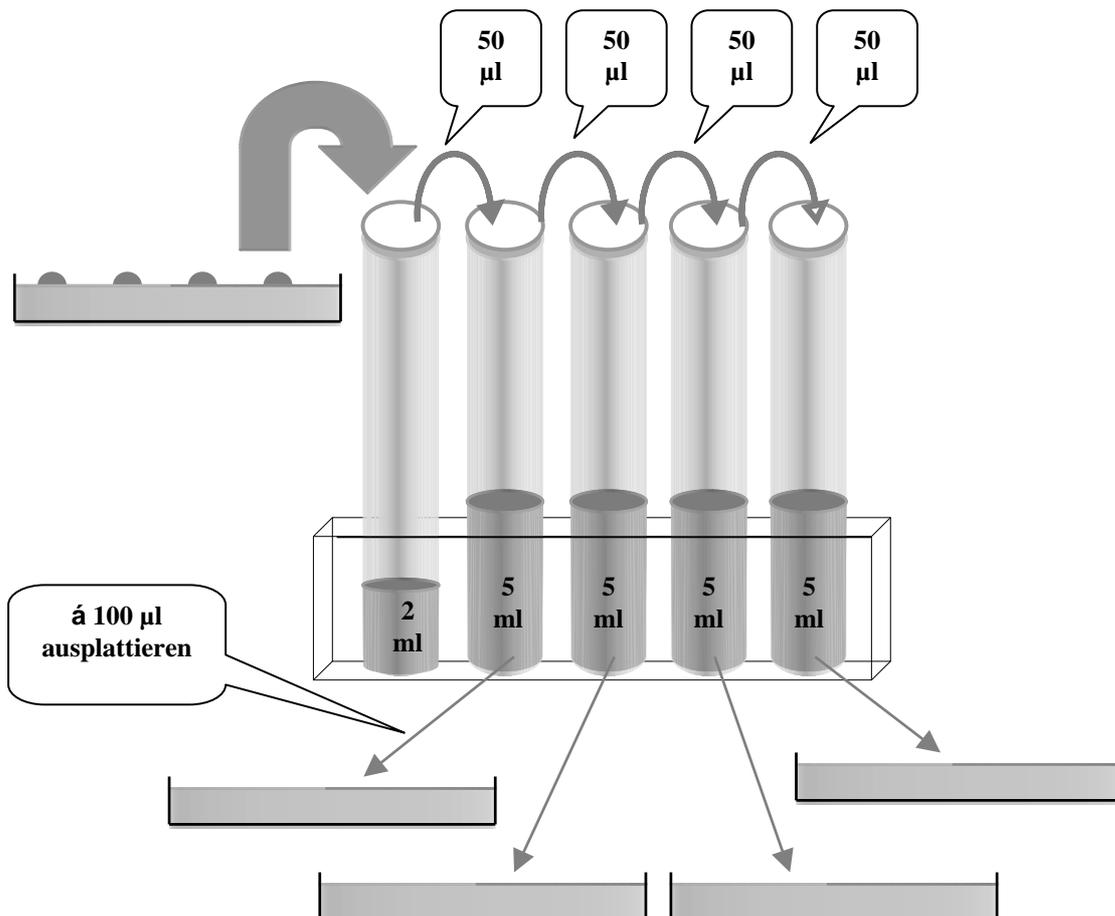
**Nachweis des durch Konjugation übertragenen Plasmids in
*Agrobacterium tumefaciens***



* siehe 2. Praktikumstag

20.3 Konjugation des *E. coli*-Stammes S 17-1 (enthält Plasmid 812) mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101pMP90 RK

Beide Bakterien-Stämme werden zur Vermehrung* in 5 ml Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt (Übernachtkultur). Weil *A. tum.* langsamer wächst, soll man zwei Tage vor der Konjugation mit der Vermehrung beginnen. Nach der Vermehrung werden die Stämme zunächst durch Zentrifugation bei 4000-5000 Upm (Raumtemperatur) von ihrem Nährmedium getrennt, im YEB-Medium aufgenommen, 1:1 gemischt (je 100 μ l) und anschließend auf YEB-Agarplatten ohne Antibiotika tropfenweise aufgetragen. Die Inkubation dauert etwa 1 Tag bei 28 °C. Nach der Inkubation werden die Bakterien mit einer Impföse aufgenommen, in 2 ml YEB-Medium resuspendiert und nach dem folgenden Schema verdünnt (s. u.)**, anschließend auf einer YEB-Agarplatte mit Rifampicin₁₀₀ und Carbenicillin₁₀₀ bei 28 °C für 2 Tage inkubiert. Danach werden die gewachsenen Kolonien daraufhin untersucht, ob das Plasmid aufgenommen wurde (siehe 3. Praktikumstag).



**E. coli* in LB-Medium + Ampicillin₁₀₀ bei 37°C unter Schütteln; *A. tum.* in YEB + Rifampicin₁₀₀ und Kanamycin₂₅ bei 28 °C unter Schütteln

** Entwickeln sich viele Kolonien, soll man die Verdünnungsreihe erweitern

5. Arbeitstag

Übersicht zur Genübertragung und zum Genübertragungsnachweis in Pflanzenzellen

Versuch 18	Gewinnung von Zellsuspensionen Sterilisation von Samen
Versuch 19	Transformation in <i>E. coli</i> zur Plasmidvermehrung Selektion Vermehrung DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 20	Konjugation Transformation in <i>E. coli</i> zur Konjugation Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + <i>E. coli</i>) Selektion DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 21	Transformation Pfl. Zellen Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + Pflanzenzellen) Selektion
Versuch 22	Nachweis des Fremdgens GUS mit X-Gluc } Blaufärbung PCR Southern-Verfahren

21.1 Transformation pflanzlicher Zellen

Im Jahr 1907 beschrieben Smith und Townsend erstmals eine Pflanzenkrankheit, die bevorzugt am Wurzelhals verschiedener Pflanzenarten in Form unterschiedlich großer Wucherungen (Tumorbildung, crown gall) auftritt. Als Verursacher vermuteten sie das weltweit verbreitete, gramnegative Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*. *A. tum.* besitzt ein ringförmiges DNA-Molekül (DNA-Plasmid), das in einer oder mehreren Kopien vorliegt. Die Plasmid-DNA enthält die genetischen Informationen für die Tumorbildung (Tumor inducing, **Ti-Plasmid**). Verantwortlich für die Veränderung der pflanzlichen Zellen ist der Einbau der DNA, die aus dem bakteriellen Plasmid stammt, in die DNA des Zellkerns der Pflanze. Die Expression der Gene dieser zusätzlichen DNA bewirkt u. a. die Bildung von Hormonen (Auxine, Cytokinine), so daß das Wachstum der infizierten Pflanzenzellen ihrer eigenen Kontrolle entzogen ist und daraus ein ungehemmtes Wachstum - ähnlich einer Tumorzelle - resultiert.

A. tum. induziert also einen pflanzlichen Tumor. Für eine dauerhafte Tumorentwicklung ist es jedoch nach Integration der tumorinduzierenden genetischen Information nicht notwendig, daß *A. tum.* weiter in den Zellen anwesend ist. Man kann die Tumorgewebe ohne *A. tum.* weiter auf entsprechendem Medium kultivieren. Das ist der Beweis, daß *A. tum.* Pflanzenzellen genetisch verändert und dadurch autonomes Wachstum erzeugt. Für die Besiedlung der Pflanzen durch das Bakterium und die damit verknüpfte genetische Modifikationen der Pflanze durch das Bakterium muß es zu einem Zusammenspiel zwischen Komponenten der Pflanze einerseits und Proteinen, die durch Ti-Plasmid kodiert werden, und weiteren chromosomal kodierten bakteriellen Proteinen andererseits kommen. Chromosomal kodiert ist die Synthese von Exopolysacchariden, die für den Kontakt des Bakteriums mit der Pflanze notwendig sind. Der Ti-Plasmid enthält die für den Transfer geeignete T-DNA sowie einen Block von Genen (*vir-Region*), die mit der Infektiosität des Bakteriums im Zusammenhang stehen. Nach einem spezifischen Schnitt in die Donor-DNA wird ein durch Protein geschützter DNA-Bereich (hier T-DNA) in die Akzeptor-Zelle und dort in den Zellkern transferiert. Auf den Transport der Fremd-DNA zum Kern spezialisierte Proteine unterstützen diesen Vorgang. Als Startsignal für die Etablierung der Wechselwirkung fungiert eine phenolische Verbindung, die von der Pflanze produziert worden ist. (z.B. ein Acetophenon). Dieses Signal wird von einem Rezeptor auf der Cytoplasma-Membran des Bakteriums erkannt und weitergeleitet. In der Folge wird ein Transkriptionsfaktor aktiviert, der wiederum andere Gene der *vir-Region* aktiviert.

Ti-Plasmide können unter bestimmten Umständen aus Bakterien isoliert bzw. in Bakterien aufgenommen werden, ohne daß dadurch die Überlebensfähigkeit der Bakterien beeinflußt wird.

Gentechniker erkannten, daß jedes fremde DNA-Stück, das in die T-DNA des Ti-Plasmids eingebaut wird, mit diesem zusammen übertragen wird. Um diese Form des Gentransfers für praktische Züchtungszwecke nutzen zu können, mußten jedoch eine Reihe von Modifikationen vorgenommen werden. Vor allem war es notwendig, die T-DNA zu entschärfen, um eine Tumorbildung bei der Pflanze zu verhindern. Die T-DNA von Plasmid pPCV812 enthält folgende Gene, die in Pflanzenzellen eingebaut werden (s. Plasmidkarte Abb. 18.1).

Ampicillin/Carbenicillin-Resistentgene (Ap/Cb)

Hygromycin-Resistentgen (Hg)

Mannopinsynthase-(MAS)-Promotor

Glucuronidase-(GUS)-Reportergen

21.2 Methoden der Genübertragung

Um Gene in Pflanzenzellen einzuschleusen, sind verschiedene Verfahren des Gentransfers entwickelt worden (s. 20.2). Eine davon basiert auf einem Mechanismus der Genübertragung, der in der Natur vorkommt, nämlich der eben beschriebenen indirekten Gentübertragung (s. 21.4) durch *A. tum.* (im Praktikum).

Prinzip:

Höhere Pflanzen schützen sich gegen Wasserverlust und Infektionen durch Ablagerung von Fetten und Wachsen auf ihren Oberflächen. Normalerweise kann *A. tum.* diese Barriere nicht überwinden. Bei Verwundung scheiden jedoch einige Pflanzenarten phenolische Inhaltsstoffe aus (s. o), die Agrobakterien aktivieren. Eine Genübertragung in Pflanzenzellsuspension benötigt jedoch keine Verwundung, da bei Schütteln während der Kultur genügend verletzte Zellen vorhanden sind.

21.3 Vitalitätstest der Karottenzellen

Vor der Transformation ist es ratsam, die Vitalität der Zellen zu erfassen. Sie läßt sich gut mit Fluoresceindiacetat (FDA) nachweisen. Fluoresceindiacetat wird in den lebenden Zellen enzymatisch in Fluorescein und Diacetat gespalten. Vitale Zellen zeigen bei dieser Nachweismethode in der blauen Erregungstrahlung (Filtereinstellung s.u.) eine gelblich grüne Fluoreszenz, während tote Zellen diese Fluoreszenz nicht zeigen. Befindet sich jedoch Chlorophyll in den Zellen, ist eine Rotfluoreszenz zu beobachten.

Die Durchführung dieser Methode erfolgt nach Widholm (1972). 20 µl einer acetonischen Stammlösung von FDA (5 mg/ml) wird 1 ml Zellsuspension zugesetzt, so daß eine Endkonzentration von 0,01% FDA erreicht wird. Nach einer Inkubation von 3 Min. bei Raumtemperatur kann man die gefärbten Zellen unter dem Auflichtilluminator beobachten.

Filtereinstellung am Auflichtilluminator (Fa. Leitz, Wetzlar):

3/3= 2x Interferenz-Blaufilter KB 490, Dichromatischer Teilerspiegel TK 400, eingebauter Sperrfilter K 515, Sperrfilter im Filterschieber K 490.

21.4 Co-Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* und Pflanzenzellen

5 Tage vor Versuchsbeginn wird 2,5 ml PCV (packed cell volume) Pflanzenzellsuspension (s. 18.1) in 250 ml Erlenmeyerkolben mit B₅-Medium subkultiviert (wird vom Betreuer durchgeführt). Nach 5 Tagen Subkultur befinden sich die Zellen in einer hohen Wachstumsphase.

2 Tage vor Versuchsbeginn wird *A. tum.* in 5 ml YEB+Cb₁₀₀ (s. 19.4) angeimpft und bei 28 °C unter Schütteln kultiviert (wird vom Betreuer durchgeführt). Nach 2 Tagen Kultur befinden sich die *A. tum.*-Zellen in der mittleren Logphase.

Es werden 2 x 1,5 ml Bakterienzellen in autoklavierte Eppendorfreaktionsgefäße überführt, anschließend wird bei 4000-5000 Upm für 10 Min. abzentrifugiert und die Überstände werden verworfen.

Die Bakteriensedimente werden in 0,5 ml B₅-Medium mit 0,5 ppm 2,4-D (s. 18.1.3) resuspendiert, in die Erlenmeyerkolben mit den Pflanzenzellen überführt und anschließend für eine halbe Stunde im Dunkeln cokultiviert. Danach wird der Kolbeninhalt zum Absetzen der Zellen in ein 250 ml Becherglas überführt und nach 20-30 Min. wird der Überstand verworfen,

das Sediment in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit B5-Medium überführt, anschließend werden die Kolben für zwei Tage im Dunkeln bei 28 °C inkubiert.

Nach 2 Tage Co-Kultur wird wiederum der Kolbeninhalt in ein 250 ml Becherglas überführt, nach dem Absetzen der Zellen (20-30 Min.) wird der Überstand verworfen, und das Sediment in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit B5-Medium + Cefotaxime/Tricarillin überführt, um *A. tum.* abzutöten und zu entfernen. Nach eintägiger Kultur wird ca. 1 ml der transgenen Zellsuspension in autoklavierte Eppendorfreaktionsgefäße überführt, anschließend bei 4000-5000 Upm für 10 Min. abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen. Das Sediment wird mit 500 µl X-Gluc (s. 22.2) resuspendiert und bei 37 °C für 12 - 16 Stunden inkubiert. Nach einer erfolgreichen Transformation werden die transgenen Zellen eine blaue Farbe aufweisen.

6. Arbeitstag

Fließschema zur Genübertragung und zum Genübertragungsnachweis in Pflanzenzellen

Versuch 18	Gewinnung von Zellsuspensionen Sterilisation von Samen
Versuch 19	Transformation in <i>E. coli</i> zur Plasmidvermehrung Selektion Vermehrung DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 20	Konjugation Transformation in <i>E. coli</i> zur Konjugation Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + <i>E. coli</i>) Selektion DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 21	Transformation Pfl. Zellen Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + Pflanzenzellen) Selektion
Versuch 22	Nachweis des Fremdgens GUS mit X-Gluc } Blaufärbung PCR Southern-Verfahren

22.1 Nachweis des eingebauten Gens

Eine Transformation ist erst dann erfolgreich abgeschlossen, wenn man die gesuchte DNA-Sequenz in transgenen Zellen bzw. Pflanzen nachgewiesen hat. Es gibt mehrere Techniken zur Identifizierung klonierter Gene, z.B.:

- 1) Der Einsatz von Farbstoffen (X-Gluc)
- 2) Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)
- 3) Blotting-Techniken (Southern Blot)

22.2 Der Einsatz von Farbstoffen

Der Gebrauch chromogener Substrate war für die Entwicklung genetischer Screeningmethoden sehr wichtig. Das bekannteste System ist die chemische Verbindung X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid), ein farbloses Substrat der in höheren Pflanzen nicht vorkommenden β -Glucuronidase (GUS). Im Praktikum wurde das GUS-Reportergen gekoppelt mit dem auf Auxin ansprechenden Mas-Promotor (Velten et al. 1984), in das Genom der Karottenzellen eingebaut. Durch Zugabe von X-Gluc zu den transgenen Zellen wird die GUS-Aktivität folgendermaßen nachgewiesen:

An der Sterilbank wird 1 ml der transgenen Zellsuspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, anschließend bei 4000-5000 Upm für 5 Min. zentrifugiert, der Überstand wird verworfen.

Das Zellsediment wird in 0,5 ml X-Gluc-Lösung resuspendiert und bei 37°C für 12 Stunden inkubiert.

Bonitur:

Die in transgenen Zellen exprimierte GUS spaltet das Substrat X-Gluc in Glucuron und ein Indolyl-Derivat, das zum blauen Dibrom-dichlor-Derivat oxidiert. Die blaue Farbe ist makroskopisch erkennbar.

X-Gluc-Lösung	<u>10 ml</u>
N,N-Dimethylformamid	10-15 Tropfen
X-Gluc	10 mg
0,1 M Phosphat-Puffer (KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄ , pH 7,0)	9,8 ml
5 mM Kalium Ferricyanid	100 μ l

5 mM Kalium Ferrocyanid	100 μ l
Triton X-100	10 μ l

Sterilfiltrieren, bei -18 °C aufbewahren.

7. Arbeitstag

Fließschema zur Genübertragung und zum Genübertragungsnachweis in Pflanzenzellen

Versuch 18	Gewinnung von Zellsuspensionen Sterilisation von Samen
Versuch 19	Transformation in <i>E. coli</i> zur Plasmidvermehrung Selektion Vermehrung DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 20	Konjugation Transformation in <i>E. coli</i> zur Konjugation Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + <i>E. coli</i>) Selektion DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 21	Transformation Pfl. Zellen Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + Pflanzenzellen) Selektion
Versuch 22	Nachweis des Fremdgens GUS mit X-Gluc } Blaufärbung PCR Southern-Verfahren

22.3 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Entwicklung der Methoden zur DNA-Klonierung in den siebziger Jahren gab der Forschung neue Impulse, denn nun konnte man Gene und Genaktivität auf eine Art studieren, die zuvor nicht möglich gewesen war. Etwas Ähnliches geschah in den achtziger Jahren, als man wiederum eine revolutionäre Methode entwickelte: die PCR.

PCR ist eine recht unkomplizierte Methode: Ein kurzer Abschnitt eines DNA-Moleküls wird viele Male von einer DNA-Polymerase kopiert.

Die PCR bewirkt die selektive Vervielfältigung eines beliebigen Abschnitts in einem DNA-Molekül. Man kann dazu jeden DNA-Bereich auswählen, vorausgesetzt, die Sequenzen an seinen Enden sind bekannt. Dies ist notwendig, da zu Beginn der PCR zwei kurze Oligonucleotidketten als "Primer" mit dem DNA-Molekül hybridisieren müssen.

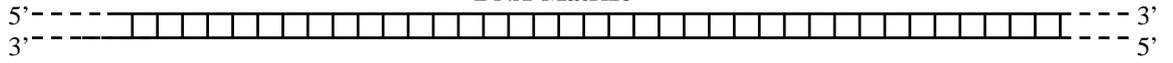
Man benutzt Sequenzteile aus der Umgebung des gewünschten DNA-Abschnitts, um zwei synthetische DNA-Oligonucleotide zu synthetisieren, deren Sequenz jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist. Diese Oligonucleotide dienen einerseits als Starthilfe (Primer) für die DNA-Synthesereaktion und andererseits begrenzen sie den zu vervielfältigenden Abschnitt am Ende der Sequenz.

22.3.1 Prinzip der PCR-Methode

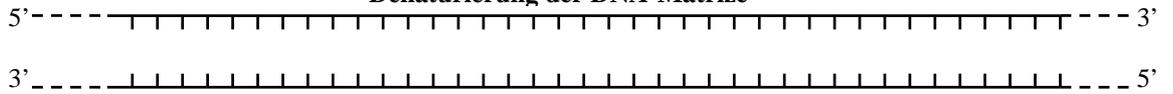
Aus Zellen isolierte DNA wird erhitzt (95 °C) und dadurch in ihre Einzelstränge zerlegt. Diese beiden DNA-Stränge läßt man mit zwei im Überschuß vorhandenen, chemisch synthetisierten DNA-Oligonucleotiden hybridisieren, die jeweils 15-30 Nucleotide lang sind und in ihrer Sequenz zu den ausgewählten Abschnitten der DNA passen. Die beiden Oligonucleotide dienen als spezifische Primer für die Synthese der DNA am Anfang bzw. am Ende der gewünschten DNA-Sequenz die von der DNA-Polymerase (Taq-Polymerase)* katalysiert wird. Dieses Enzym kopiert die DNA, die sich zwischen den Oligonucleotiden befindet. Nach mehreren Reaktionszyklen liegen viele Kopien des gesuchten DNA-Abschnittes vor. Das Prinzip der PCR ist auf der nächsten Seite dargestellt.

*Das Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) lebt in heißen Quellen, und viele seiner Enzyme, so auch Taq-Polymerase, sind hitzestabil, das heißt, sie werden bei hohen Temperaturen nicht denaturiert. Die Hitzestabilität der Taq-Polymerase ist eine wesentliche Voraussetzung für die PCR.

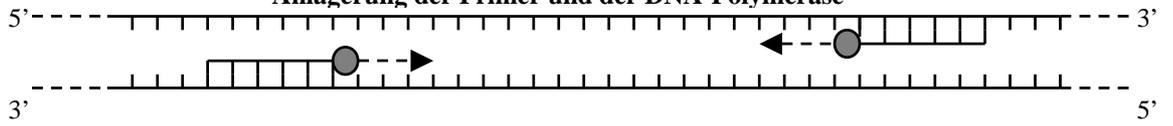
DNA-Matrize



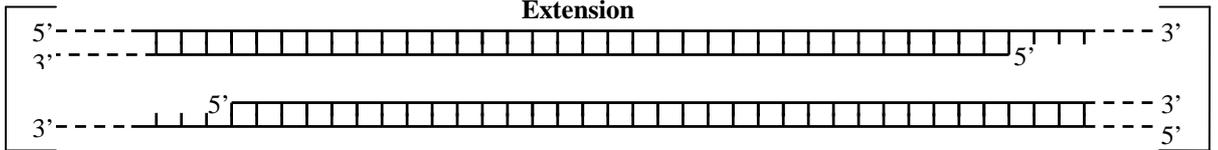
Denaturierung der DNA-Matrize



Anlagerung der Primer und der DNA-Polymerase

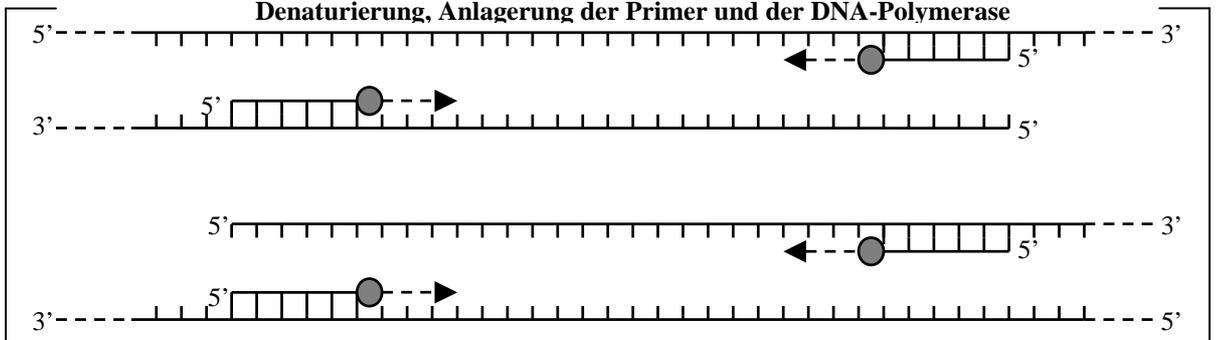


Extension

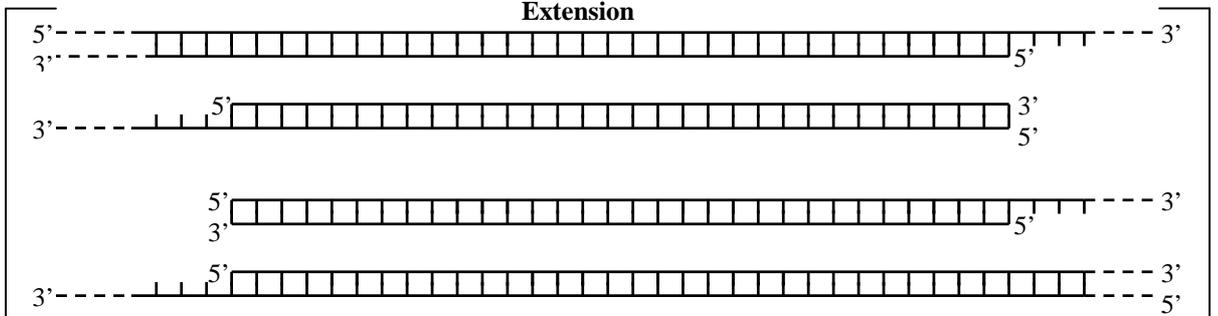


Produkte
des ersten
Zyklus

Denaturierung, Anlagerung der Primer und der DNA-Polymerase

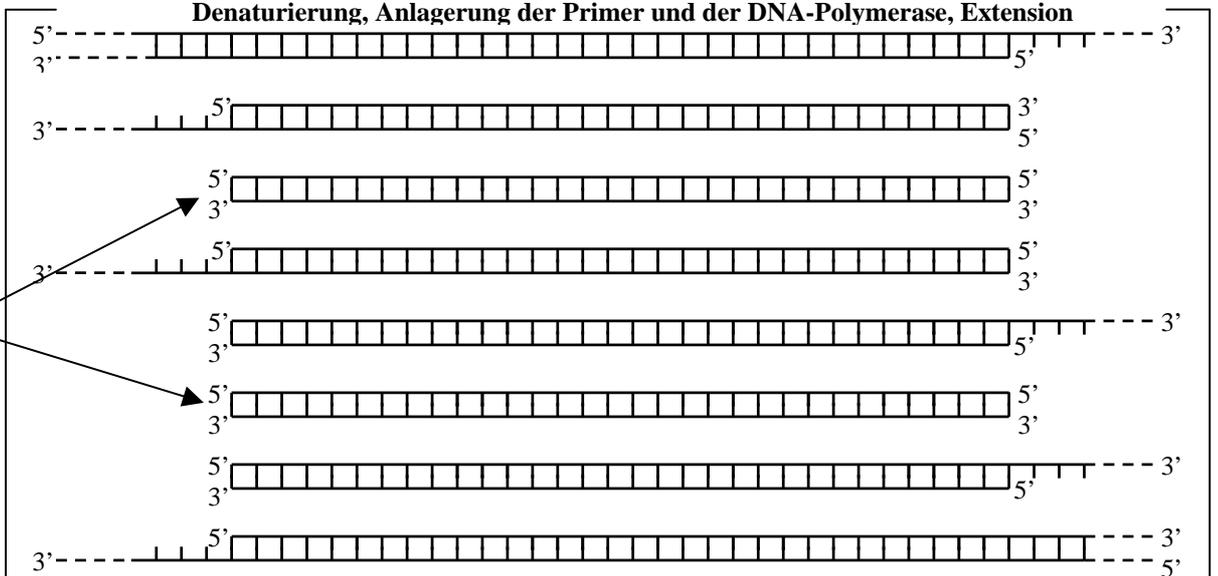


Extension



Produkte
des zweiten
Zyklus

Denaturierung, Anlagerung der Primer und der DNA-Polymerase, Extension



Produkte
des dritten
Zyklus

Vermehrung
der Ziel-
Sequenzen

Das Prinzip der PCR

Die Temperatur des Reaktionsansatzes wechselt in jedem Zyklus zwischen drei Werten:

1. der Denaturierungstemperatur (ca. 94 °C), bei der durch Lösen der Basenpaarungen die DNA-Einzelstränge entstehen, die dann in der nächsten Syntheserunde als Matrize dienen.
2. Hybridisierungstemperatur (hier 54 °C, sonst abhängig von der Zusammensetzung der Nucleotide), bei der sich die Primer an die Matrize heften,
3. die Temperatur, bei der die de novo DNA-Synthese stattfindet (ca. 72 °C), sie liegt knapp unterhalb des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase.

22.3.2 PCR-Reaktionsansatz

Die PCR wird in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist wie folgt:

10 µl	DNA (3-10 ng)
5 µl	10 x µl PCR-Puffer
1 µl	10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
1 µl	10 µM je „Primer“-Oligonukleotid
0,5 µl	Taq-Polymerase
31,5 µl	bidest. Wasser
50 µl	

Der Ansatz wird mit 50 µl Mineralöl überschichtet (zur Verhinderung von Kondenswasserbildung. Da moderne PCR-Gräte eine temperierten Deckel besitzen, ist die Anwendung des Mineralöls nicht notwendig). Die PCR-Reaktion erfolgt ca. 35 bis 50 Zyklen in einem automatischen PCR-Gerät (Thermocycler). Die PCR-Zyklen werden bei folgenden Parametern durchgeführt:

- | | | | |
|-------------|-------|-------|--|
| Programm 1: | 45 °C | 2 min | Vorheizen des Thermoblocks |
| Programm 2: | 95 °C | 3 min | Denaturierung der DNA vor Zyklusbeginn |

Programm 3:

1. Segment	95 °C	1 min	Denaturierung
2. Segment	50 °C	2 min	Annealing (Hybridisierung)
3. Segment	72 °C	2 min	Amplifikation

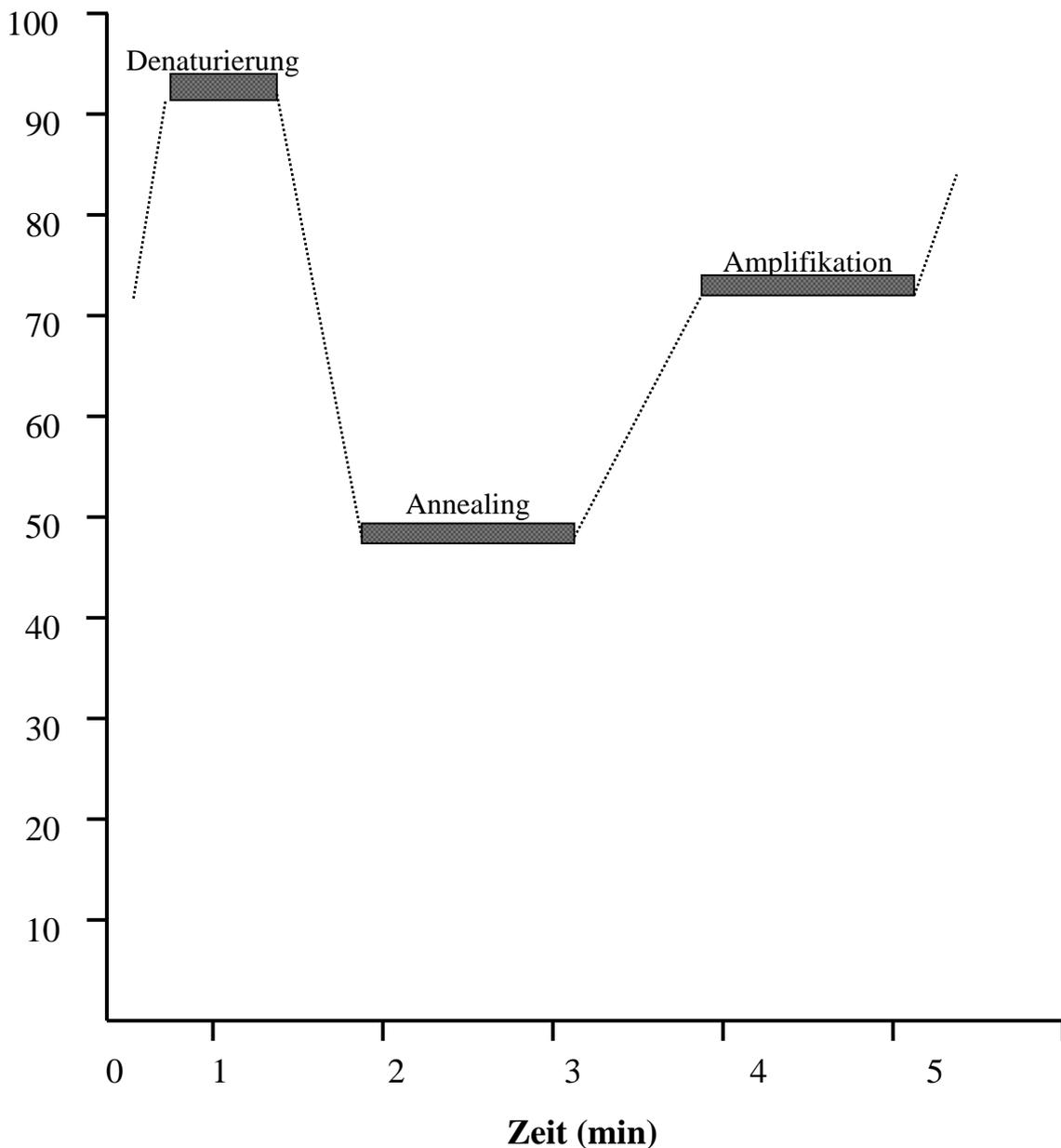
35-50 Zyklen

Programm 4: 72 °C 5 min Eine anschließende Amplifikation

Programm 5: 4 °C Lagerung bis Gelelektrophorese

In der folgenden Abbildung ist die Reaktionstemperatur schematisch dargestellt.

Temperatur
(°C)



22.3.3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte (siehe auch Seite 91-118)

Bei den meisten PCR-Experimenten erfolgt die Überprüfung des Ergebnisses, indem man einen Teil des Reaktionsansatzes über ein 1,5 % iges Agarose-Gel trennt.

Nach der Färbung mit Ethidiumbromid erkennt man in der Regel eine Bande (s. Abb. 22.1)

Fehlt die erwartete Bande oder sind weitere Banden vorhanden, muß das Experiment wiederholt werden.

22.4 Extraktion pflanzlicher DNA

Die Extraktion pflanzlicher DNA erfordert folgende Schritte:

- 1) die Zellwand muß aufgebrochen werden¹
- 2) die Zellmembran muß so aufgelöst sein, daß die DNA aus der Zelle in den Extraktionspuffer übertritt²
- 3) die DNA muß vor DNase geschützt sein³
- 4) Denaturierung sowie Entfernung von Proteinen⁴
- 5) Ein Brechen der DNA muß möglichst gering gehalten werden⁵

22.4.1 CTAB-Preparation pflanzlicher Gesamt-DNA

CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid = Cetrimid Hexadecyltrimethylammoniumbromid (MG 364,5 g)

Formel: $C_{16}H_{33}NCH_3)_2Br$

Die Methode macht sich die Eigenschaft von RNA und DNA zunutze, bei einer hohen Salzkonzentration in Gegenwart von CTAB (Lösung 2 X CTAB) in Lösung zu bleiben, bei Reduzieren der Salzkonzentration unter 0,4 M jedoch mit CTAB zu präzipitieren (Lösung CTAB-Präzipitationspuffer ,s. S. 211). Viele der pflanzlichen Polysaccharide sind in keiner dieser Salzkonzentrationen löslich und können deshalb bei hoher Salzkonzentration von den sich in der Lösung befindenden Nucleinsäuren getrennt werden.

Vor Beginn des Experiments: - Sterilbank einschalten

¹ in Trockeneis bzw. flüssiger Stickstoff mörsern

² Dazu Detergenz SDS oder CTAB

³ EDTA ist ein Chelat, das Mg^{2+} bindet. Das Mg ist ein wichtiger Cofaktor für Nucleasen

⁴ Chloroform / Phenol (s. S. 211)

⁵ DNA in der Lösung kann durch ein schnelles Schütteln beschädigt werden

- Wasserbad auf 65 °C stellen
- Lösungen unter 4. und 8. im Wasserbad erhizten
- flüssigen N₂ besorgen
- Abnutschapparatur aufbauen

1. Einen Teil der Zellsuspension mit einer sterilen Gewebekulturpipette an der Sterilbank entnehmen, anschließend abnutschen
2. Proben von 1 g FG einwiegen und unter Zugabe von flüssigen N₂ (**Vorsicht!!**) mörsern
3. Den Vorgang 2-3 mal wiederholen
4. Auf die Probe 1 µl/mg 65 °C heißen 2x CTAB Extraktionspuffer geben, anschließend in ein autoklaviertes Eppendorfreaktionsgefäß überführen und 3 Min. ins Wasserbad stellen
5. 1 Volumenteil (VT) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzupipettieren, vorsichtig und gut mischen (zwischen zwei Fingern schaukeln)
6. 5-10 Min. bei 13000 Upm zentrifugieren (Raumtemperatur)
7. Die obere Phase in ein autoklaviertes Eppendorfreaktionsgefäß überführen
8. 1/10 Volumenteil (VT) 65 °C heiße 10% CTAB-Lösung hinzupipettieren
9. 1 VT Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugeben und gut mischen
10. 5-10 Min. bei 13000 Upm zentrifugieren
11. Autoklaviertes Eppendorfreaktionsgefäß mit 1 VT CTAB-Präzipitationspuffer vorlegen
12. Überstand der zentrifugierten Proben sehr sauber abnehmen und zum CTAB-Präzipitationspuffer pipettieren, 20 Min. stehen lassen, anschließend 10-15 Min. bei 13000 Upm zentrifugieren
13. Überstand verwerfen
14. Pellet in 400 µl TE-Highsalt-Puffer aufnehmen und gut lösen (15-30

Min. ruhig stehen lassen)

15. gelöste Nukleinsäure mit 2 VT 96% Ethanol fällen und 5 Min. bei Raumtemperatur (RT) stehen lassen
16. 10 Min. bei 13000 Upm zentrifugieren
17. Überstand verwerfen und Pellet mit 80% Ethanol waschen, 10 Min. bei RT stehen lassen
18. 10 Min. bei 13000 Upm bei RT zentrifugieren
19. Überstand verwerfen und Pellet trocknen, danach in 100 µl 1x TE-Puffer gut lösen
20. RNase-Verdau bei 50 °C mit ca. 10µg RNase A anschließen (s. 19.6.1)

Geräte:

autoklavierte Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 ml)
autoklavierte Pipettenspitzen: weiße, gelbe, blaue
Ständer für Eppendorfreaktionsgefäße
Tischzentrifuge
Wasserbad
steriler Mörser und Pistill
sterile Gewebekulturpipetten
Schwarzbandfilter
Abnutschflasche
Vakuumpumpe
Analysenwaage
sterile Löffel
Themocycler

Lösungen:**2x CTAB**

2% CTAB (w/v)
100 mM Tris (pH 8,0)
20 mM EDTA (pH 8,0)
1,4 M NaCl

10% CTAB

10% CTAB (w/v)
0,7 M NaCl

CTAB-Präzipitationspuffer

1% CTAB (w/v)
50 mM Tris (pH 8,0)
10 mM EDTA (pH 8,0)

TE-Highsalt-Puffer

10 mM Tris (pH 8,0)
1 mM EDTA (pH 8,0)
1 M NaCl

1x TE-Puffer

10 mM Tris (pH 8,0)
1 mM EDTA (pH 8,0)

Alle Lösungen autoklavieren und bei Raumtemperatur aufbewahren

Ethanol: 70%
80%
96%

Chloroform/Isoamylalkohol 24:1

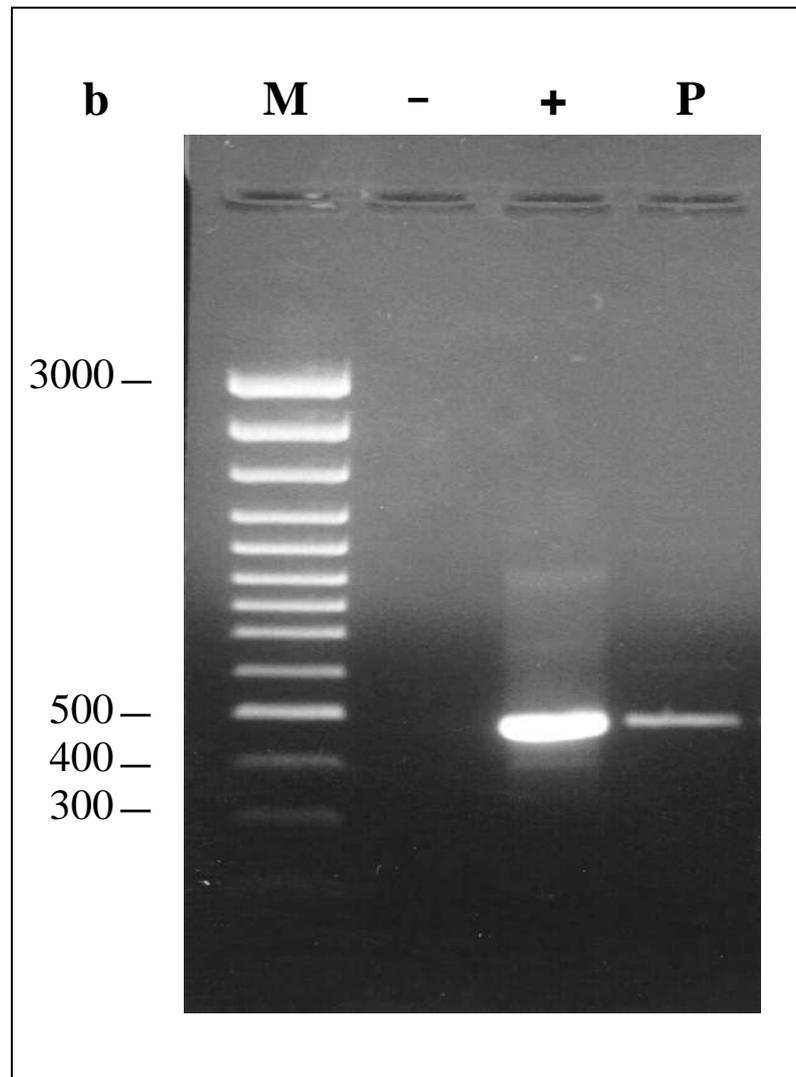


Abbildung 22.1: Nachweis des MAS-Promoters in Genom transgener Karottenzellen durch Amplifizierung einer ca. 430 bp-Sequenz aus dem MAS-Promoter durch das PCR-Verfahren. M: Marker; - : Negativkontrolle; +: Positivkontrolle; P: transgene Karottenzelle

8. Arbeitstag

Fließschema zur Genübertragung und zum Genübertragungsnachweis in Pflanzenzellen

Versuch 18	Gewinnung von Zellsuspensionen Sterilisation von Samen
Versuch 19	Transformation in <i>E. coli</i> zur Plasmidvermehrung Selektion Vermehrung DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 20	Konjugation Transformation in <i>E. coli</i> zur Konjugation Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + <i>E. coli</i>) Selektion DNA-Präparation DNA-Identifizierung
Versuch 21	Transformation Pfl. Zellen Co-Kultur (<i>A. tum.</i> + Pflanzenzellen) Selektion
Versuch 22	Nachweis des Fremdgens GUS mit X-Gluc } Blaufärbung PCR Southern-Verfahren

22.5 Spaltung Gesamt- DNA

10 µg genomische DNA (Gesamt-DNA)wird mit dem Restriktionsenzym Hind III gespalten. Die Auswahl des Restriktionsenzym Hind III ist damit begründet, daß dieses Enzym nicht das gesuchte Gen im Pflanzengenom spaltet (s. Plasmidkarte , Abb. 18.1).

Der Restriktionsspaltungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl setzt sich folgendermaßen zusammen:

Genomische DNA (10 µg)	20	µl
10x M-Puffer	5	µl
Hind III	3	µl
bidest. Wasser	<u>22</u>	µl
	50	µl

Die Spaltung des Genoms erfolgt über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschrank. Zur Überprüfung des vollständigen Verdauens der DNA wird 3 µl Probe mittels eines analytischen Gels getrennt (s. 19.8).

Der Rest der gespaltenen DNA-Probe wird auf ein präparatives Gel aufgetragen, wofür ein 1%-iges (w/v), ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (low-melt-point Agarose) vorbereitet wird. Die Probe wird mit 10 µl Ladepuffer versetzt und anschließend in den vierten Slot („Tasche“ auf dem Gel aufgetragen, wobei in dem dritten Slot die ebenso gespaltene DNA nicht transgener Karotten als negative Kontrolle dient. Zur Erkennung der Fragmentlänge wurde ca. 300 ng Längenmarker Lamda/Hind III in den ersten Slot pipettiert. In den siebten Slot wird das mit Hind III gespaltene Plasmid pPCV812 mit MAS-Promotor (1-10 ng) als Positivkontrolle pipettiert.

Für die Elektrophorese wird 1x TBE-Puffer, pH 8,0, verwendet, sie erfolgt bei 120 V und 70 mA für ca. 10 Stunden unter Kühlung mit Leitungswasser. Danach wird das Gel unter UV-Licht fotografiert.

22.6 Southern-Verfahren

Southern Blot ist eine der am meisten benutzten Techniken für die Genomanalyse (Southern 1975, Sambrook 1989). Das ist eine effiziente Methode zur Übertragung der DNA-Banden aus dem Agarosegel auf eine Membran zwecks Hybridisierung sowohl radioaktiv als auch nichtradioaktiv) einer Probe. Der Transfer der DNA erfolgt mit dem durch Kapillarkräfte erzeugten Pufferstrom (Kapillar-Transfer).

22.6.1 Gelbehandlung

Das Gel wird für ca. 30 min in 1,8 %iger HCl unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Blaumarker-Banden (Bromphenolblau) ins gelbliche verfärben. Dadurch wird die DNA partiell depuriniert, was bei der nachfolgenden Denaturierung eine Fragmentierung der DNA zur Folge hat. Der Schritt dient der Erhöhung der Transfereffizienz großer DNA-Fragmente (>23 kb). Anschließend wird das Gel für ca. 35 min in 200 ml Alkali-Transfer-Puffer, bis die Blaumarker-Banden wieder blau sind, inkubiert, wodurch die DNA im Gel denaturiert wird. Nur einzelsträngige DNA bindet an der Membran.

22.6.2 Blotaufbau

Der Blot wird in Anlehnung an Maniatis et al. (1982) und Mason and Williams (1985) aufgebaut (s. Abb. 22.2). Eine Schale wird mit Transfer-Puffer gefüllt, in welche eine Filterpapierbrücke (Whatman 3) eintaucht, die auf einer über die Schale gelegten Glasplatte aufliegt. Auf die mit Transfer-Puffer befeuchtete Filterbrücke wird das Gel, mit der Oberseite nach unten, aufgelegt und mit der mit bidest. Wasser befeuchteten, nucleinsäurebindenden Nylonmembran (Hybond N⁺) der Firma Amersham bedeckt. Diese wird mit in Transfer-Puffer getränkten Filterpapieren (Whatman 3) überdeckt. Darauf folgt ein Stapel Papierhandtücher, die von einem Gewicht beschwert werden. Filterpapiere, Membran und Papierhandtücher werden auf Gelgröße geschnitten. Die Fläche um das Gel herum wird mit Parafilmstreifen abgedeckt. Abbildung 22.2 zeigt den Blockaufbau.

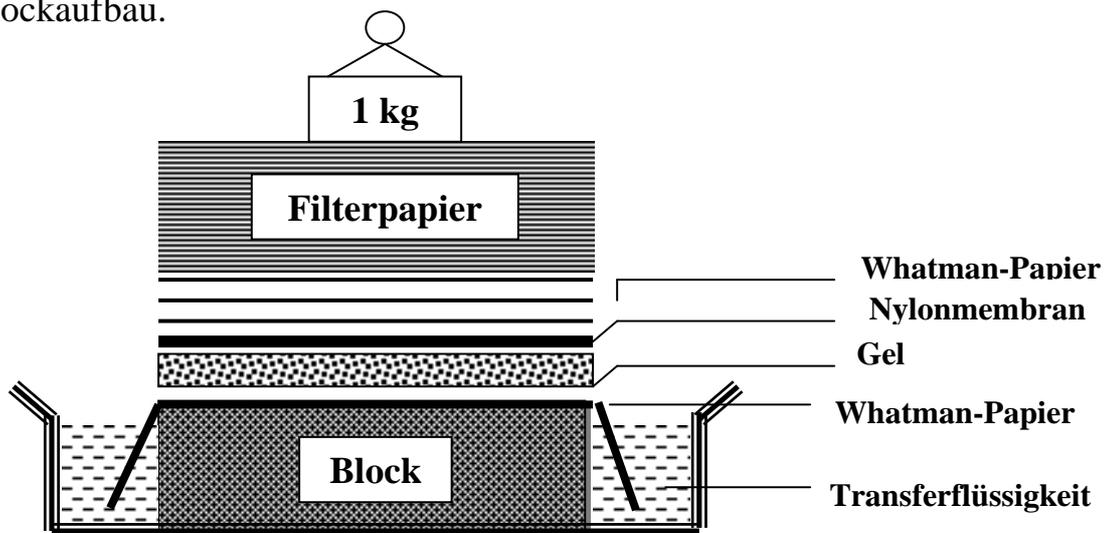


Abbildung 22.2: Das Schema verdeutlicht den Aufbau der Transfer-Anordnung. Die Abbildung wurde aus Maniatis et al. , “ Molecular Cloning - A Laboratory Manual“, 1982 entnommen.

Der Transfer der DNA erfolgt mit dem durch Kapillarkräfte erzeugten Pufferstrom.

Nach einer Transferzeit von ca. 16 Stunden wird der Blot abgebaut. Die Lage der Gelslots wird auf dem Filter mit einem Bleistift durch Einstiche markiert. Ob der Transfer vollständig ist, läßt sich unter UV-Licht (254 nm) feststellen. Die durch Ethidiumbromid angefärbten Banden dürfen im Gel nicht mehr zu sehen sein.

Die Membran kann dann, luftgetrocknet, sehr lange (einige Wochen bis Monate) aufbewahrt werden.

22.6.3 Kovalente Bindung der DNA an die Membran

Eine kovalente Bindung der membrangebundenen DNA ist nötig, da diese ansonsten durch das in den Hybridisierungs- und Waschlösungen enthaltene SDS sukzessive von der Membran abgewaschen würde (Anderson und Young 1985). Durch UV-Bestrahlung entstehen kovalente Bindungen zwischen primären Aminogruppen der Nylonmembran und dem Thymin der DNA (Church und Gilbert 1984). Hierbei wird der Blot, mit der DNA-Seite nach oben, in UV-Crosslinker eingelegt, anschließend eine Minute crossgelinkt.

22.6 Herstellung der Sonde

Ca. 5 µg gereinigter Plasmid-812 mit eingebautem MAS-Promotor wird mit dem Restriktionsenzym Hind III/SstI gespalten und ein ca. 2300 bp langes Fragment im Bereich der T-DNA (s. Plasmidkarte Abb. 18.1) wird durch ein präparatives Gel isoliert.

Der Restriktionsspaltungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 30 µl setzt sich folgendermaßen zusammen:

Plasmid-DNA (5 µg)	10	µl
10x M-Puffer	3	µl
Hind III	1,5	µl
bidest. Wasser	15,5	µl
	<hr/>	
	30	µl

Die Spaltung des Plasmids erfolgt ca. 5 Stunden bei 37 °C im Inkubationsschrank. Zur Überprüfung des vollständigen Verdauens des Plasmids werden 3 µl Probe mittels eines analytischen Gels getrennt.

Der Rest der gespaltenen Plasmidprobe wird für ein präparatives Gel verwendet, wozu ein 1%-iges (w/v), ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (low-melt-point Agarose) vorbereitet wird. Die Probe wird mit 5 µl Ladepuffer versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zur Erkennung der Fragmentlänge werden ca. 300 ng des Längenmarkers Lambda/Hind III in den Slot neben der Probe pipettiert.

Für die Elektrophorese wird 1x TBE-Puffer, pH 8,0, verwendet, sie erfolgt bei 100 V und 70 mA für ca. 2 Stunden.

Nach Ablauf der Elektrophorese wird die die Sonde repräsentierende Bande auf dem UV-Transilluminator unter UV-Licht (366 nm) aus dem Gel mit einem Skalpel herausgeschnitten und auf zwei Eppendorfreaktionsgefäße verteilt.

22.7.1 Isolierung DNA-Fragmente aus dem Gel

Für die Isolierung der Bande aus dem Gel kann man verschiedene Methoden anwenden. Das gängige Verfahren ist die Glasmilch-Methode.

Die Elution der DNA aus Agarose-Gelstücken durch die Glasmilch-Methode basiert auf der Löslichkeit der Agarose in hoch konzentriertem Kalium- bzw. Natriumjodid. Dabei wird die DNA isoliert, indem die DNA-Moleküle sich an die Glaspartikeln heften. Diese Methode ist schnell durchführbar und die dadurch isolierte DNA hat einen hohen Reinheitsgrad, so daß keine Phenol-Chloroform-Extraktion notwendig ist. Bei dieser Methode ist die höchste Ausbeute bei der Isolierung von Fragmentgrößen zwischen 300-3000 Basenparen zu erreichen. Hierbei wird ein borationenfreies Puffersystem (TAE) verwendet, da die Haftung der DNA-Moleküle an die Glaspartikel durch Borat-Ionen gestört wird.

Die klein geschnittenen DNA-haltigen Agarosestücke werden mit dreifachem Volumen 6 M Natriumjodid-Lösung versetzt. Durch 10minütige Inkubation bei 55°C werden die Agarose-Gelstücke aufgelöst. Abschließend wird eine homogen gemischte Glaspartikelsuspension (5 µl pro 5 µg DNA) dem Ansatz zugefügt. Der Ansatz wird unter gelegentlichem Schwenken 15 min auf Eis inkubiert. Dadurch wird die DNA an die Oberfläche der Silica-Matrix adsorbiert. Die Glaspartikel-DNA-Suspension wird durch kurze Abzentrifugation (5 Sec bei 13000 rpm) pelletiert und der Überstand aus Natriumjodid und Agarose entfernt. Das Pellet wird mit der Waschlösung durch dreimaliges Resuspendieren und Pelletieren gewaschen. Die DNA wird durch zweimal wiederholte Elutionsschritte gewonnen, indem das DNA-Glaspartikelpellet im gewünschten H₂O-Volumen (5 - 10 µl bidest. Wasser) resuspendiert, für 5 Min. bei 55°C inkubiert und kurz abzentrifugiert wird. Die DNA befindet

sich in der wäßrigen Phase und steht für die weitere Bearbeitung zur Verfügung.

Waschlösung (New-Wash)

50 % Ethanol
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA

pH auf 7,8 einstellen.

Die DNA-Konzentration wird anschließend spektrophotometrisch ermittelt (s. 19.7) und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

22.7.2 Markierung der Sonde**Nicht-radioaktive Markierung der Sonde**

Einige Kits z.B. der auf antikörpervermittelter Farbreaktion beruhende „DIG DNA Labelling and Detection Kit“ der Firma Boehringer Mannheim bieten eine Nicht-radioaktive Markierung der Sonde an. Nach Erhitzen (95 °C, Trennung der DNA in ihre Einzelstränge) der isolierten Template-DNA (s. 22.11.1) und mit anschließender Abkühlung auf Eis wird dNTP-Mix, Klenow-DANN-Polymerase (Bestandteile des „Labelling- und Detection-Kits“) und Desoxyuridin-Triphosphat (dUTP) hinzugefügt. Das dUTP ist über einen Spacer mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin verbunden (Dig-dUTP). Nach Inkubation für 60 min. bei 37°C wird die Reaktion abgestoppt, gefällt (s. 19.6.2) und anschließend durch Zentrifugation pelletiert. Das DIG-markierte Pellet wird dann in TE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Im Gegensatz zur radioaktiv-markierten Sonde, kann man DIG-markierte Sonden für eine lange Zeit lagern. Die radioaktiv-markierte Sonde ist für ihre Sensibilität bekannt.

Nach Hybridisierung an die Ziel-DNA auf der Membran mit Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase-Konjugat wird die Membran in einer Farbreaktionslösung inkubiert. Nach der Abspaltung des Substrats werden die Banden auf der Membran sichtbar.

Das Schema soll das Prinzip einer nicht-radioaktiven Sonde und anschließender Detektion darstellen:

Inkubation der Membran
mit Blocking-Puffer
(Sättigung der freien Stellen)



Hybridisierung der Membran
mit



Hybridisierung der Membran
mit Anti-DIG-alkalisches
Phosphatase-Konjugat



Inkubation der Membran mit
Farbreaktionslösung
(die Bande wird sichtbar)



Radioaktive Markierung der Sonde (s.a. S. 129 ff)

Die radioaktive Markierung der Sonde erfolgt mit dem Rediprime (Fa. Amersham).

50 ng des isolierten Fragments wird in 45 µl bidest. H₂O aufgenommen und 5 min bei 95 °C denaturiert. Sofort danach wird sie 5 min auf Eis gekühlt, um die DNA-Einzelstränge zu konservieren, anschließend wird kurz abzentrifugiert.

Denaturierte DNA wird zu dem auch die DNA-Polymerase enthaltenden Labellingmix (Fa. Amersham) gegeben und durch Schnippen gemischt bis blaue Färbung auftritt. Dazu wird 5 µl (50 µCi) [³²P]dCTP gegeben und vorsichtig gemischt. Die Probe wird dann bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Bei Ende der Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA-Lösung gestoppt, anschliessend werden dazu 50 µl dd H₂O pipetiert.

22.7.3 Abtrennung der freien Nucleotide

Da bei der Reaktion die Nucleotide im Überschuß zugegeben werden, liegen am Ende der Reaktion noch nicht eingebaute Nucleotide vor. Sie müssen entfernt werden, da es sonst, bei Verwendung der Probe als Gensonde zu unspezifischer Bindung von Nucleotiden aus dem Labellingmix kommt, und die Signale undeutlich werden. Zum Abtrennen der Nucleotide wird eine Sephadex G-50 Säule (s.a. S. 45 ff) verwendet. Sie trennt mittels des sog. Molekularsiebeffekts kleine von größeren Molekülen ab. Die Abtrennung der Nucleotide erfolgt mit Quick Spin Colum Sephadex G 50 .

Die Säule wird mit 100 µl radioaktiv markierter Sonde beladen und 4 min bei 1.100 g zentrifugiert. Die Fraktion wird in einem verschließbaren 0,5 µl Eppendorfgefäß gesammelt.

22.8 Prähybridisierung

Um unspezifische Bindungen auf den Filtern zu vermeiden, müssen die Bindungsstellen auf dem Filter abgesättigt werden. Dies erfolgt durch den Vorgang der Prähybridisierung. Die Membran wird nach dem Cross-Linken eingerollt und anschließend in Hybridisierungsröhrchen eingelegt. 1 ml pro 1 cm² Membranfläche mit der Hybridisierungslösung Rapid-hybridbuffer wird in Röhrchen eingefüllt und fest verschlossen. Danach wird das

Hybridisierungsröhrchen in den Hybridisierungsofen eingelegt und für mind. 2 Stunden bei einer Temperatur von 65 °C drehend inkubiert.

22.9 Hybridisierung

Nach der Prähybridisierung wird die denaturierte Sonde zugesetzt, und für ca. 12 Stunde bei 60 °C inkubiert.

22.9.1 Waschen der Membran

Nach dem Ablauf der Hybridisierungszeit wird das Hybridisierungsglasröhrchen abgekühlt und dessen Inhalt in den Radioaktivitätsabfall entsorgt. Die Membran wird noch in dem Hybridisierungsglasröhrchen für 30 min bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus 2 x SSC 0,1 X SDS gewaschen, anschließend wird sie eingeschweißt und danach einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham) exponiert.

Die nach der Waschzeit zu messende Hintergrundstrahlung bestimmt, ob noch weiter gewaschen werden muß. Man sollte aber nicht zuviel waschen, da sonst die Oligonucleotidbindung, die ja sehr schwach ist, schnell abgewaschen wird. Hier ist es ratsamer, die Membran zuerst vorläufig einer Fluorographie (z. B. für einige Stunden mit einer Verstärkerfolie (Screen) bei - 70 °C) zu unterwerfen. Sollten die Signale zu unspezifisch sein, kann man immer noch weiter nachwaschen.

22.10 Autoradiographie

Der noch feuchte Filter wird in Plastikfolie eingeschweißt und in eine mit einem "Intensifying Screen" versehene DuPont Cronex Casset gelegt und mit einem Röntgenfilm für die erforderliche Zeit, ca. 1-2 Tage, bei -70 °C exponiert (s. Radiobiochemie).

Nach Ablauf der Expositionszeit wird der Röntgenfilm entwickelt. Hierzu wird er für 5 Min im Entwickler inkubiert, 1 min in Wasser zum Abstoppen bewegt und 4 min unter Bewegung fixiert. Der fixierte Film wird gewässert und getrocknet.

Die Abbildung 22.3 zeigt einen Abzug des entwickelten Röntgenfilms.

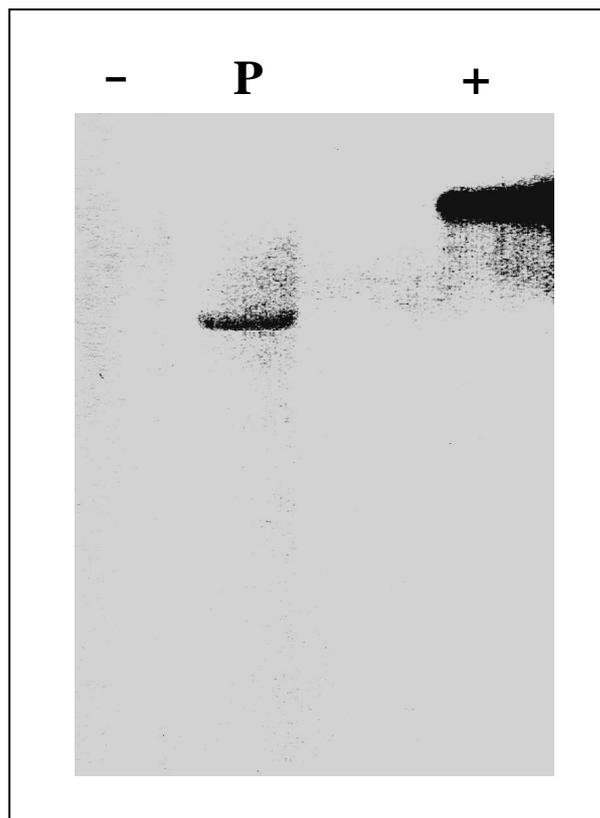


Abbildung 22.3: Nachweis des Gens MAS/GUS in Genom transgener Karottenzellen durch das Southern-Verfahren. —: Negativkontrolle: nicht transgene Karotten; +: Positivkontrolle: pPCV812 MAS/GUS; P: transgene Karottenzelle.

Die Positivkontrolle mit der kürzeren Laufstrecke ist der größere linearisierte Plasmid während die kleinere T- DNA der Karottenzellen eine längere Laufstrecke aufweist.

Literatur:

Anderson, M. and Young, B. (1985): Quantitative filter Hybridisation
in: Hames, B.; Higgins, S. :Nucleic acid hybridisation. A practical
Approach
IRL Press Oxford 1985

Church, G.; Gilbert, W. (1984): Genomic sequencing
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81 : 991-1995

Gamborg ,O.L., Miller, R. A., Ojima, K., (1968): Nutrient requirement of
suspension cultures of soybean root cultures. Expl. Cell Res. 50, 151-158.

Imani, J., A. Berting, S. Nitsche, S. Schäfer, W. H. Gerlich und K.-H.
Neumann (2002): The integration of a major hepatitis B virus gene into
cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in
regenerated carrot plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 71(2): 157-
164.

Koncz, C., Langridge, W. H .R., Olsson, O., Schell, J., Szalay, A. (1990):
Bacterial and Firefly Luciferase Genes in Transgenic Plants: Advantages
and Disadvantages of a Reporter Gene. Developmental Genetics. 11, 224-
232

Maniatis,T.,Fritsch,T.;Sambrook, E. (1982): Molecular Cloning- A
Laboratory Manual”
Cold Spring Harbor Laboratories, New York.

Murray, M.G.; Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular
weight plant DNS. Nucleic Acid Research, 8(19), pp. 4321-4325.

Neumann, K.-H. (2000) Some studies on somatic embryogenesis, a tool in
plant biotechnology.
Geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/pdf/p000004.pdf

Rogers, S.O.; Bendich, A.J. (1985). Extraction of DNA from milligram
amounts of fresh, herbarian and mummified plant tissue. Plant Molecular
Biology, 5, pp. 69-76

Schäfer, F., Grieb, B., Neumann, K. H., (1988): Morphogenic and histological events during somatic embryogenesis in intact carrot plantlets (*Daucus carota* L.) in various nutrient media. *Bot. Acta* 101, 362-365.

Simon, R. (1984): High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Mol Gen Genet.* 196, 413-420

Taylor, B.; Powell, A. (1982): Isolation of plant DNA and RNA. *BRL Magazin Focus*, 4(3), pp.4-6

Van Haute, E., Maes, J. H., Warren, M., Van Montagu, M., Schell, J. (1983): Intergenic transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: A novel strategy for the received genetic of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBOJ.* 2, 411-417

Van Larebeke, N., Genetello, C., Hernalsteens, J. P., Depicker, A., Zaenen, I., Messens, E., Van Montagu, M., Schell, J. (1977): Transfer of Ti-plasmid between *Agrobacterium*-strains by mobilization with the conjugative plasmid RP4. *Mol. Gen. Genet.* 152, 119-124

Velten, J.; Velten, L.; Hain, R.; Schell, J. (1984): Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal* vol. 3 No. 12 pp. 2723-2730.

Vervliet, G. et al. 1975: *Gen virol.* 26:33-48

10. Weiterführende Literatur

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, L.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. (1990). *Molekularbiologie der Zelle.* VCH Verlagsgesellschaft

Brown, T.A. (1996). *Gentechnologie für Einsteiger.* Spektrum Akademischer Verlag

Mülhardt, C. (2000): *Der Experimentator: Molekularbiologie.* 2. Auflage. Spektrum Akad. Verlag.

Grieb, B. (1992): Untersuchungen zur Induktion der Kompetenz zur somatischen Embryogenese in Karotten-Petiolenexplantaten (*Daucus carota* L.). Histologie und Proteinsynthesemuster. Wiss. Verl. Maraun, Frankfurt/Main

Halbrock, K. ; Seadler, H. ; Salamini, F. und Schell, J. (1991): Pflanzenzüchtung aus der Nähe gesehen. Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln.

Potrykus, I. & Spangenberg, G. (1995): Gene Transfer to Plants. Springer Verlag, Lab Manual.

Knippers, R. (1997): Molekulare Genetik. Thieme-Verlag, 7. Auflage.

Neumann, K.H.; Grieb, B. (1992): Somatische Embryogenese bei höheren Pflanzen: Grundlagen und praktische Anwendung. Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Univ. zu Berlin, R. Mathematik/Naturwiss. 41, (3) 63-80.

Neumann, K.H., (1995): Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen. UTB für Wissenschaft, Ulmer-Verlag

Sambrook, J. Fritsch, EF., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, 9.31-9.46

Gelvin S. B.; Schilperoort R. B. (1994): Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers.

Anhang

Betriebsanweisung für ein gentechnisches Laboratorium der Sicherheitsstufe 1 (§ 12 Abs. 2 GenTSV)

1. Organisation
 - 1.1 Allgemeine Hinweise
 - Gentechnische Arbeiten dürfen nur in gentechnischen Anlagen durchgeführt werden
 - Die Durchführung einer gentechnischen Arbeit ist aufzeichnungspflichtig.
 - 1.2 Geltungsbereich
 - 1.3 Das in der gentechnischen Anlage beschäftigte Personal ist vom Projektleiter oder dessen Beauftragten mit den Sicherheitsregeln vertraut zu machen (§ 12 Abs. 3 GenTSV)
 - 1.4 Schwangerschaften sowie beeinträchtigte Abwehrlagen sind so früh wie möglich dem Projektleiter mitzuteilen, damit zusätzliche Schutzmaßnahmen oder eine Arbeitsplatzwechsel veranlaßt werden können.
2. Verhalten im Labor
 - 2.1 Schutzkleidung und persönliche Schutzmaßnahmen sind entsprechend sachgerechter guter mikrobiologischer Technik zu handhaben.
 - 2.2 Vor Aufnahme der Arbeiten hat sich jeder Benutzer des Labors über Standort und Funktion von:
 - Desinfektionsmittel
 - Feuerlöscheinrichtungen
 - Erste-Hilfe-Einrichtungen
 - Augenduschen
 - Körperduschensowie über
 - Fluchtplanzu informieren.

-
- 2.3 Die Labortüren und -fenster sind während des Arbeitens im Labor geschlossen zu halten.
 - 2.4 Im Labor ist immer ein geschlossener kochbarer Laborkittel zu tragen, dessen Ärmel nicht über die Handgelenke hochgestreift oder -gekrempt werden dürfen.
 - 2.5 Im Labor ist immer festes, geschlossenes und trittsicheres Schuhwerk zu tragen
 - 2.6 Beim Arbeiten mit Arbeitsstoffen, die bei Hautkontakt gesundheitsgefährdend sein können, sind Einmalhandschuhe zu verwenden. Einmalhandschuhe sind durch Umstülpen auszuziehen und dürfen nicht wiederverwendet werden.
 - 2.7 Arbeitskleidung ist immer getrennt von der normalen Kleidung aufzubewahren.
 - 2.8 Das Mundpipettieren ist im Labor untersagt. Es müssen mechanische Pipettierhilfen verwendet werden.
 - 2.9 Das Labor soll aufgeräumt und saubergehalten werden. Das Aufbewahren von nicht unmittelbar im Labor benötigten Gegenständen im Labor ist zu vermeiden. Dies gilt auch für Bücher und Schreibmaterial.
 - 2.10 Das Essen, Trinken, Rauchen, Schnupfen und Schminken ist im Labor untersagt.
 - 2.11 Lebensmittel dürfen nicht in das Labor hineingebracht oder dort aufbewahrt werden.
 - 2.12 Auf den Arbeitsflächen sollen nur die unmittelbar benötigten Geräte und Materialien lagern.
 - 2.13 Vorräte sollen nur in dafür vorgesehenen Räumen oder Schränken gelagert werden.
 - 2.14 Ungeziefer muß bei Auftreten regelmäßig bekämpft werden.
 - 2.15 Bei allen Tätigkeiten ist grundsätzlich darauf zu achten, daß Spritzer und Aerosole (flüssige und feste Schwebstoffe) vermieden werden.

Dies gilt insbesondere für Tätigkeiten wie Umfüllen, Pipettieren, Beimpfen, Rühren, Schütteln, Zentrifugieren, Hochdruckpressen und Arbeiten mit Ultraschall.

- 2.16 Schreib- und Arbeitsflächen sind getrennt zu halten.
- 2.17 Gezielte Verhaltensregeln
Die biologische (gentechnische) Identität der verwendeten Zelllinien und Mikroorganismen ist regelmäßig zu überprüfen und zu protokollieren.
Die Überprüfung der Biologischen Identität erfolgt bei jeder Subkultur durch den Zusatz der dem Marker entsprechenden Antibiotika.
- 2.18 Geräte und Materialien, die aus dem Labor herausgebracht werden sollen und bei denen nicht ausgeschlossen werden kann, daß sie mit biologischen Agenzien kontaminiert sind, müssen vorher im Labor desinfiziert oder sterilisiert (autoklaviert) werden.
3. Hygiene, Transport und Entsorgung
 - 3.1 Laborkittel und Einmalhandschuhe sind vor dem vorübergehenden Verlassen des Labors innerhalb desselben abzulegen; eine Ausnahme ist nur bei unmittelbar anschließendem Betreten eines benachbarten Labors zugelassen.
 - 3.2 Chemikalien dürfen außerhalb des Labors nur in geschlossenen Behältnissen transportiert werden, Glasbehälter müssen dabei immer mit Geräten transportiert werden, die ein sicheres Halten und Tragen ermöglichen (z.B. Eimer oder Tragekästen mit Haltegriffen).
 - 3.3 Grundsätzlich gilt, daß alle Abfälle, die biologische Agenzien (einschließlich Nukleinsäuren) enthalten können, autoklaviert werden sollen.
 - 3.4 Bei der Entsorgung ist grundsätzlich darauf zu achten, daß durch die Wahl entsprechender Sammelbehälter Verletzungsgefahren durch spitze, scharfkantige oder splitternde Gegenstände auch auf dem weiteren Entsorgungsweg ausgeschlossen sind.
4. Unfall und Erste Hilfe

-
- 4.1 Unfälle im Labor sind sofort dem Projektleiter oder einem anderen Vorgesetzten mitzuteilen und zu protokollieren.
 - 4.2 Verletzungen im Labor sind im Rahmen der üblichen Erste-Hilfe-Maßnahmen sofort zu desinfizieren, zu versorgen und anschließend dem Projektleiter oder einem anderen Vorgesetzten mitzuteilen. Diese haben ggf. einen Krankenwagen anzufordern und einen Bereitschafts- oder Betriebsarzt hinzuziehen. Ärzte und Rettungspersonal sind grundsätzlich unter Vorlage des Verzeichnisses biologischer Agenzien im Labor über mögliche Infektionsgefahren zu informieren. Gegenstände, die eine Verletzung verursachen, sowie andere mögliche Infektionsquellen sind sicherzustellen.
 - 4.3 Unfälle und Verletzungen mit biologischen Agenzien sind zusätzlich dem Beauftragten für die Biologische Sicherheit mitzuteilen.
 - 4.4 Kontaminierte Körperteile sind mit alkoholischem Händedesinfektionsmittel zu desinfizieren.
 - 4.5 Kontaminierte Flächen mit Desinfektionsmittel auf Aldehyd- oder Peroxyessigsäure-Basis desinfizieren (Gesichtsschutz, Einmal-Handschuhe!) und die betroffenen Laborbereiche für andere deutlich warnend zu markieren.
 - 4.6 Größere kontaminierte Flüssigkeitsmengen mit aufsaugendem Material bedecken, dieses ist anschließend in geeigneten Behältern einzusammeln und zu sterilisieren (autoklavieren).
 - 4.7 Kontaminierte Kleidungsstücke zu sammeln und durch Autoklavieren zu dekontaminieren.
5. Verzeichnis von Arbeitsanweisungen und Auflistungen
 - 5.1 Nach Beendigung der Arbeiten im Labor und vor dem Verlassen desselben sind die in der Betriebsanweisung Hygiene im Biologischen Sicherheitslabor der Sicherheitsstufe 1 und 2 in der Betriebsanweisung Entsorgung biologischer oder biologisch kontaminierter Agenzien und Materialien im Biologischen Sicherheitslabor der Sicherheitsstufe 1 und 2 in der Betriebsanweisung Gefährliche Arbeitsstoffe (BG Chemie „Sichere

Biotechnologie) und in den Allgemeinen Sicherheitsvorschriften des Instituts vorgesehenen Maßnahmen durchzuführen.

- 5.2 Die Bedienung von Autoklaven ist ausschließlich hierfür gesondert eingewiesenen Personen gestattet.
- 5.3 Die Betriebsanweisung Arbeiten mit Radioisotopen und Arbeiten mit ultravioletten Lichtquellen sind für entsprechende Arbeiten einzuhalten.
- 5.4 Die Bedienungsanleitung des Autoklaven und der Zentrifugen sind einzuhalten.
- 5.5 Es ist ein Log-Buch über die im Labor vorhandenen GVO* und die sonstigen biologischen Agenzien (jegliche im Labor vorhandene gentechnisch veränderte DNA) und die damit durchgeführten Arbeiten zu führen.

* Gentechnisch veränderter Organismus

5.6 Telefonverzeichnis und Fluchtplan

Projektleiter:

privat:

dienstl.:

Beauftragter für die Biologische Sicherheit

dienstl.:

Polizei

Feuerwehr

Universitäts-Nummern:

Notarzt

Notarztwagen

Betriebsärztin

Durchgangsarzt

Intensivstation

Augenklinik
Uni-Klinik

Sonstige Krankenhäuser:

6. Als gültige gesetzliche Vorschriften sind zu berücksichtigen:
 - 6.1 Sicherheitsfibel des Instituts
 - 6.2 Gültige gesetzliche Vorschriften
Gentechnikgesetz, Gentechnik-sicherheitsverordnung,
Aufzeichnungs-verordnung, Bundesseuchengesetz,
Gefahrstoffverordnung, Mutterschutzgesetz, Arbeitsstättenverordnung,
Druckbehälterverordnung.
 - 6.3 Merkblätter der zuständigen Berufsgenossenschaft
z.B. Sichere Biotechnologie Laboratorien (B 002, ZH 1/342)
Betrieb (B 003, ZH 1/343)
Viren (B 004, ZH 1/344)
Parasiten (B 005, ZH 1/345)
Bakterien (B 006, ZH 1/346)
Pilze (b 007, ZH 1/347)
der BG Chemie.