

Biochemisches Praktikum

Arbeitsanleitung

WS 2016/2017

Institut für Veterinär-Biochemie
Fachbereich Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin
Oertzenweg 19b
14163 Berlin

07.10.2016

Liebe Studierende,

willkommen beim Biochemischen Praktikum der Veterinärmedizin.

In den nächsten Wochen werden wir Sie durch 7 verschiedene Laborversuche führen.

Viel Erfolg beim Praktikum wünscht Ihnen

das Team des Instituts für Veterinär-Biochemie

Wichtige Vorbemerkungen zum Ablauf des Biochemie-Praktikums

Allgemeine Informationen zum Praktikum

Das Praktikum der Biochemie findet in der ersten Hälfte des 3. Semesters statt.

Für die Teilnahme im Wintersemester sind die Studierenden teilnahmeberechtigt, die das Vorphysikum erfolgreich absolviert haben und alle drei vorangegangenen Lehrgespräche im Sommersemester bestanden haben. Die Studierenden müssen im Wintersemester im dritten oder höheren Fachsemester immatrikuliert sein und sich fristgerecht im Campus Management System angemeldet haben.

Leistungsanforderungen

Es sind sieben Hauptversuche zu absolvieren. Alle Hauptversuche sind in zwei bis vier Teilversuche untergliedert. Zur Vorbereitung auf die Versuche wird auf die vorgegebenen theoretischen Lernziele, die Einführungsveranstaltung (Blackboard) sowie die Vorlesung Biochemie verwiesen; die theoretischen Kenntnisse werden zu Anfang durch ein Antestat überprüft. Die exakte Durchführung und Auswertung der einzelnen Versuche und das Erreichen der praktischen Lernziele werden zum Schluss in einem Abschlussgespräch nachgeprüft.

Lernziele

Allgemein

Das Erarbeiten und Verstehen von biochemischen Vorschriften, der Einsatz von wichtigen Laborgeräten sowie das Portionieren von Flüssigkeiten (Pipettieren) mit unterschiedlichen Hilfsmitteln und akkurate biochemische Arbeiten soll trainiert werden. Spezielle theoretische und praktische Lernziele sollen vermittelt und anschließend in einem Protokoll sowie einer Abschlussbesprechung dargestellt und zusammengefasst werden.

Theoretische Lernziele	Praktische Lernziele
PROTEINE	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aminosäuren ▪ Gruppeneinteilung ▪ Ninhydrin-Reaktion ▪ Titrationskurven ▪ pI ▪ Proteinstrukturen ▪ Peptidbindung ▪ Arten der N-Ausscheidung ▪ Harnstoffzyklus 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aminosäure-Nachweis mittels Ninhydrin ▪ Bildung und Nachweis von Harnstoff in der Leber
ENZYME	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enzymkinetik ▪ Enzymregulation ▪ Photometrie 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Enzymaktivitätsbestimmung ▪ Photometrie
KOHLLENHYDRATE	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aufbau und Einteilung der Kohlenhydrate optische Aktivität ▪ Ringbildung ▪ reduzierende Zucker ▪ Glykogen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Funktionsweise eines Polarimeters ▪ Erfassung der optischen Aktivität von Glukose und Fruktose ▪ Hydrolyse und Messung von Glykogen
LIPIDE	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eigenschaften polar-unpolar ▪ Lipidklassen ▪ Ketonkörper und deren Bedeutung im Stoffwechsel ▪ Triacylglycerine und Verdauung ▪ Entstehung von Radikalen ▪ Trennverfahren von polaren/unpolaren Molekülen ▪ Bedeutung indirekter Nachweisverfahren ▪ Absorptionsspektren ▪ Redoxreaktionen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nachweis von Ketonkörpern ▪ Titration ▪ Dünnschichtchromatographie ▪ Extraktion

Theoretische Lernziele	Praktische Lernziele
BIOLOGISCHE OXIDATION	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Grundlagen der Spektrophotometrie - Lambert-Beersches Gesetz ▪ Redoxreaktionen ▪ Struktur der Mitochondrien ▪ Atmungskette ▪ Enzymkinetik 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Präparation von Mitochondrien ▪ Arbeiten mit Enzymen ▪ Substratabhängigkeit von Enzymreaktionen
NUKLEINSÄUREN	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nukleotide ▪ Polymerisation ▪ Arten ▪ Unterschiede und Funktionen von Nukleinsäuren ▪ Prinzipien der Reinigung und Charakterisierung ▪ Elektrophorese ▪ Fluoreszenzfärbung ▪ Absorptionsspektren ▪ Nukleasen ▪ Plasmide 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reinigung und Quantifizierung von DNA ▪ Quantitäts-/Qualitätsberechnung ▪ Agarosegel-Elektrophorese ▪ Restriktion eines Plasmids ▪ Größenbestimmung
HORMONE & VITAMINE	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hormonklassen ▪ Wirkungsweisen von wasser- bzw. lipidlöslichen Hormonen ▪ Insulin (Synthese, Aufbau, Wirkungsweise) ▪ Diabetes mellitus ▪ Prinzip eines Immunoassays ▪ Vitaminklassen (wasserlöslich/fettlöslich) ▪ Funktionen von Vitamin C 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Berechnung und Verdünnung einer Standard-Reihe ▪ semiquantitatives Dot-Blot-Verfahren ▪ Erarbeitung eines Protokolls zur Extraktion von Vitamin C ▪ Messung des Vitamin C-Gehalts

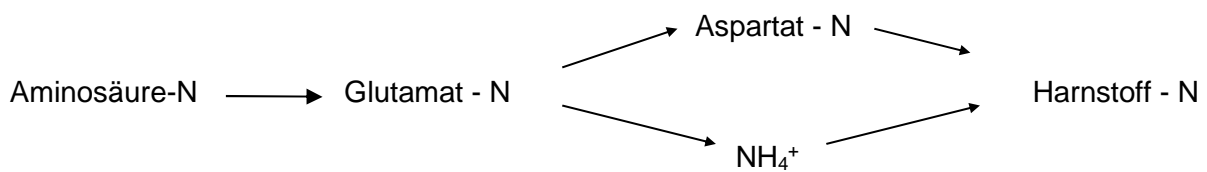
Inhaltsverzeichnis

Wichtige Vorbemerkungen zum Ablauf des Biochemie-Praktikums	1
Lernziele.....	1
Inhaltsverzeichnis	4
1 PROTEINE	5
1.1 Bestimmung der Arginaseaktivität in der Leber	5
1.2 Bestimmung freier Aminosäuren mit Ninhydrin.....	7
2 ENZYME	9
2.1 Elektrophoretische Trennung der LDH-Isoenzyme im Agarosegel	11
2.2 Bestimmung der Anreicherung des Enzyms Lactatdehydrogenase.....	13
3 KOHLENHYDRATE	19
3.1 Isolierung von Glykogen aus Leber-Säurehydrolysat und Nachweis der Glukose	19
3.2 Bestimmung der Glukose-6-Phosphatase-Aktivität in einem Leberextrakt.....	21
3.3 Untersuchungen zur optischen Aktivität von Kohlenhydraten	24
4 LIPIDE.....	26
4.1 Bestimmung von D-3-Hydroxybutyrat im Rinderblut (vom Schlachthof)	26
A. Schnellbestimmung von β -Keton (D-3-Hydroxybutyrat) im Blut.....	26
B. Enzymatische Bestimmung von D-3-Hydroxybutyrat im Blut (Testbesteck Roche) ...	27
4.2 Enzymatische Spaltung von Triacylglycerinen durch Pankreaslipase.....	28
4.3 Bestimmung der Peroxidzahl eines Fettes	30
5 BIOLOGISCHE OXIDATION	31
5.1 Gewinnung von Mitochondrien aus Herzmuskel und Messung der Succinat-Dehydrogenase-Reaktion	32
5.2 Aufnahme der Absorptionsspektren von oxidiertem und reduziertem Cytochrom C ..	35
5.3 Untersuchung der Cytochrom C-Oxidase.....	36
6 NUKLEINSÄUREN	37
6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut (Schweineblut, gerinnungsgehemmt, Schlachthof).....	40
6.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit	41
6.3 Enzymatische Spaltung von DNA.....	42
6.4 Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA.....	42
7 HORMONE / VITAMINE	43
7.1 Nachweis der Insulinwirkung im Blut	43
7.2 Insulinnachweis mit Dot Blot	44
7.3 Charakterisierung und Trennung von Vitaminen	48

1 PROTEINE

1.1 Bestimmung der Arginaseaktivität in der Leber

Von sogenannten ureotelen Lebewesen wird Aminosäurenstickstoff hauptsächlich in Form von Harnstoff ausgeschieden. Die beiden Stickstoffatome des Harnstoffs stammen von zwei Vorläufern ab: dem Ammoniumion und der Aminosäure Asparaginsäure. Der Weg des Aminosäurenstickstoffs geht aus folgendem Schema hervor:



Die Harnstoffsynthese läuft in der Leber ab. Der letzte Schritt der Harnstoffsynthese ist die Arginasereaktion, in deren Verlauf Arginin zu Ornithin und Harnstoff hydrolysiert wird.

Versuchsprinzip:

Arginin wird mit Leberhomogenat (Enzymquelle, Schweineleber v. Schlachthof) inkubiert. Die nach 10 Minuten entstandene Menge an Harnstoff wird mit Hilfe von Urease enzymatisch bestimmt. Urease spaltet Harnstoff hydrolytisch in Ammoniak und Kohlensäure. Die aus Ammoniak entstandenen Ammoniumionen bilden mit Salicylsäure und Natriumhypochlorit einen Farbstoff, dessen Extinktion der Harnstoffkonzentration proportional ist und bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen wird.

Versuchsdurchführung:

Arginasereaktion:

Probe	0	0'	P1	P2
HClO ₄ 0,5 mol/L	0,1 mL	0,1 mL	—	—
Arginin 0,1 mol/L	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Carbonatpuffer 0,1 mol/L, pH 9,5	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL
Homogenat	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL

Der Nullwert und die Probe werden als Doppelbestimmung angesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad wird die Reaktion mit 0,1 mL HClO₄ (0,5 mol/L) in Probe P1 und P2 abgestoppt.

Probe 0 ist ein Probenblindwert, der später von den Werten der Proben 1 und 2 subtrahiert wird.

Für die Harnstoffbestimmung werden jeweils 0,05 mL aus dem Arginase-Versuchsansatz (Probe 0, 0', P1, P2) verwendet.

Der Standard wird als Doppelwert (Standard1 + Standard2) angesetzt.

Harnstoffbestimmung:

	Leerwert	Standard1	Standard2	0	0'	P1	P2
Probe	—	—	—	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
Standard	—	0,05 mL	0,05 mL	—	—	—	—
Puffer/Urease Salicylsäure	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL

Ansätze mischen und mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.

Anschließend in jedes Röhrchen 2,5 mL Na-Hypochlorit pipettieren, gut mischen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Innerhalb von 1 h sind die Extinktionen von Standard und Proben gegen den Leerwert zu messen.

Auswertung:

Es wird zunächst die in der Arginase-reaktion entstandene Harnstoffmenge in μmol berechnet. Die Konzentration des Harnstoffstandards beträgt 30 mg/100 mL, die Molmasse 60 g/mol.

Davon werden 0,05 mL in die Urease-Reaktion eingesetzt:

0,05 mL Harnstoffstandard = μmol Harnstoff

Die Harnstoffmenge in 0,05 mL **Probe** beträgt dann

$$\text{Harnstoffmenge}_{\text{Probe}} (\mu\text{mol}) = \frac{E_{\text{Pr.}}}{E_{\text{St.}}} \times 0,25 \mu\text{mol}$$

Mittels dieses Wertes lässt sich die Arginaseaktivität in $\mu\text{mol}/\text{min} = \text{I.E.}$ des Leberhomogenats errechnen.

E_{st} : Extinktion des Harnstoffstandards

E_{Pr} : Extinktion der Probe

1.2 Bestimmung freier Aminosäuren mit Ninhydrin

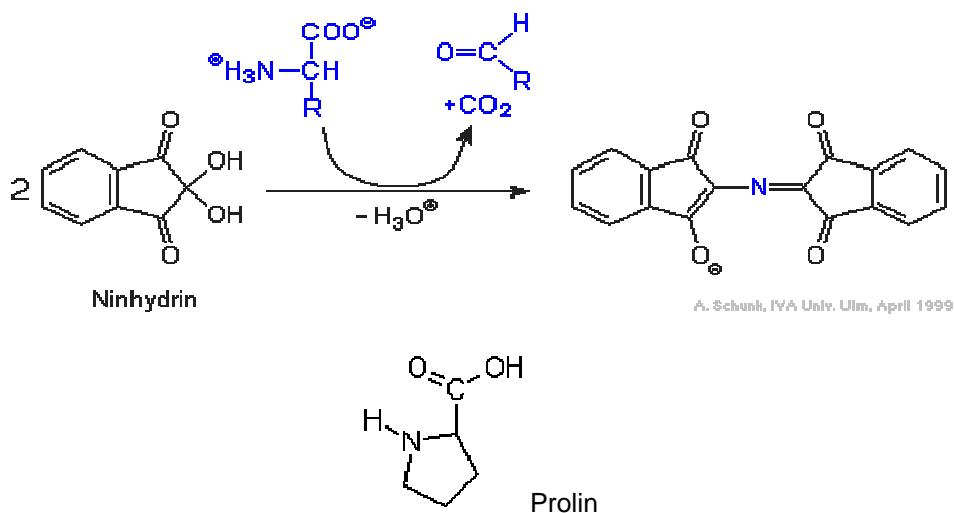
Die Menge der freien Aminosäuren im Blut variiert mit dem zeitlichen Abstand von der Nahrungsaufnahme und dem Proteingehalt der Nahrung. Zu einer starken Erhöhung der Aminosäurekonzentration des Blutes kann es bei einem akuten Leberschaden (reduzierte Desaminierungsrate) kommen. Unter dem Einfluss anaboler Hormone (Wachstumshormon, Insulin) sinkt der Aminosäurespiegel.

Versuchsprinzip:

Die gängigste Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Aminosäuren (z.B. im Blutplasma) ist die Ninhydrinreaktion. Aufgrund ihres gleichartigen Aufbaus lassen sich alle α -Aminocarbonsäuren mittels der Ninhydrinreaktion nachweisen bzw. quantitativ bestimmen.

Für die Pyrrolidincarbonsäure Prolin gilt dies nicht. Ninhydrin reagiert mit den primären Aminogruppen, wobei nach Dimerisierung ein typischer rot-blauvioletter Farbstoff (Ruhemanns Purpur) entsteht.

Die Extinktion dieses Farbstoffes kann bei 570 nm gemessen werden. In der Reaktion wird die Aminosäure decarboxyliert und die Aminogruppe auf Ninhydrin übertragen, wobei aus der Aminosäure ein Aldehyd hervorgeht. Das nun entstandene primäre Amin reagiert dann mit einem weiteren Molekül Ninhydrin, wodurch der Farbstoff Ruhemanns Purpur entsteht. Da Prolin eine sekundäre Aminogruppe enthält (2 Kohlenstoff-Atome an Stickstoff gebunden), kann die Aminogruppe nicht auf Ninhydrin übertragen werden, es entsteht das gelb gefärbte Additionsprodukt aus einem Molekül Ninhydrin und Prolin.



Die Farbreaktion wird häufig zur Visualisierung von Aminosäuren nach chromatographischen oder elektrophoretischen Methoden benutzt. Die Ninhydrin-Reaktion kann aber auch zur Visualisierung von Fingerabdrücken in der Forensik dienen. Der Hautschweiß enthält kleine Mengen freier Aminosäuren, welche mittels Ninhydrin angefärbt werden können. Eine weitere Anwendung ist der Nachweis freier Aminosäuren im Blutplasma. Im Versuch soll die Konzentration einer unbekanntes Aminosäurelösung anhand eines Standards bestimmt werden. Die unbekanntes Aminosäurelösung simuliert dabei ein Blutplasma, das durch die Fällung seiner Proteine zuvor enteiweißt worden ist.

Versuchsdurchführung:

Auf einem Blatt Papier werden Fingerabdrücke genommen. Diese werden mit einer Ninhydrinlösung besprüht und die Flecken bei 60-80°C für ca. 20-30 Minuten entwickelt.

Während der Entwicklungszeit soll der Aminosäuregehalt einer ausgegebenen Probe bestimmt werden. Die Probenbezeichnung lautet im weiteren Text **X**.

Herstellung einer Aminosäure-Eichkurve aus einer Glycin-Stammlösung (3mg/mL):

	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5
	... mg/mL	... mg/mL	... mg/mL	... mg/mL	... mg/mL
Glycin-Stammlösung (3mg/mL)	100µL	100 µL	100 µL	100µL	100µL
H ₂ O	500µL	300µL	200µL	140µL	100µL

Die Standards sind gut zu mischen, bevor sie in den folgenden Ansatz pipettiert werden.

Welche Konzentrationen ergeben sich für die einzelnen Standards?

Pipettierschema zur Bestimmung von **X**:

	Leerwert	St. 1	St. 2	St. 3	St. 4	St. 5	X
Puffer	20µL	20µL	20µL	20µL	20µL	20µL	20µL
Standard	-	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	-
Probenlösung	-	-	-	-	-	-	25µL
Ninhydrin	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL
H ₂ O	25µL	-	-	-	-	-	-

Die Ansätze sind in Eppendorfgefäße zu pipettieren und gut zu mischen, bevor sie für 10 Minuten bei 37°C inkubiert werden.

In der Zwischenzeit werden für jeden Ansatz (7 Stück) 950µL Ethanol_{abs.} in je ein neues Eppendorfgefäß pipettiert.

Nach der Inkubation sind die Gefäße zum Abkühlen der Lösung **kurz** auf Eis zu stellen.

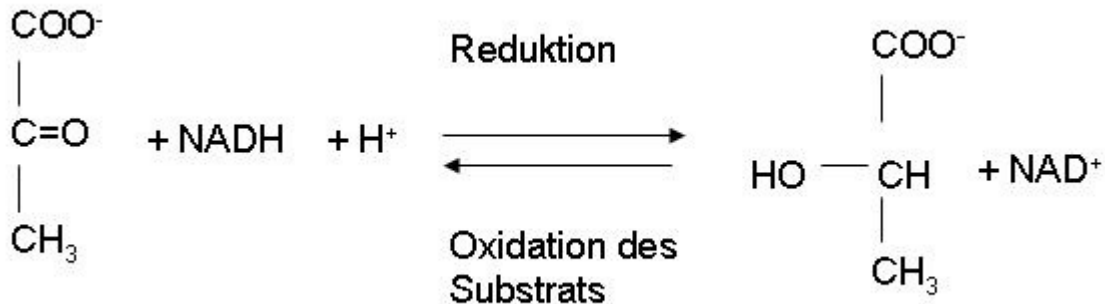
Jedem Ansatz sind 50µL zu entnehmen und in die 950µL Ethanol_{abs.} zu pipettieren.

Die Extinktionen werden am Fotometer bei einer Wellenlänge von 570nm ermittelt und die Werte grafisch dargestellt.

Mit Hilfe der Grafik lässt sich die Konzentration der ausgegebenen Probe ermitteln.

2 ENZYME

Das Enzym Lactatdehydrogenase (Bestandteil der anaeroben Glykolyse) katalysiert die folgende Reaktionsgleichung:



$$K = \frac{[\text{Laktat}] \times [\text{NAD}^+]}{[\text{Pyruvat}] \times [\text{NADH}] \times [\text{H}^+]}$$

Bei pH 7,0 ($[\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ mol / L}$) beträgt die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion $3,62 \times 10^4 \text{ x L x mol}^{-1}$

Das bedeutet, dass das Pyruvat quantitativ zu Lactat umgesetzt wird; Lactat wird unter den gleichen Bedingungen jedoch nicht quantitativ zu Pyruvat oxidiert. Das gelingt nur, wenn Pyruvat und (oder) H^+ im linken Teil der Reaktionsgleichung ständig aus dem Gleichgewicht entfernt werden.

Enzymaktivität:

Die Geschwindigkeit des durch ein Enzym unter definierten Bedingungen (Substratüberschuss, pH 7, 25°C) katalysierten Substratumsatzes wird als dessen Aktivität bezeichnet. Als SI-Einheit ist das Katal ($1 \text{ kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$) festgelegt. Daneben ist die Internationale Einheit (I.E. bzw. IU) noch gebräuchlich ($1 \text{ I.E.} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). Eine wechselseitige Umrechnung der Angaben kann nach $1 \text{ I.E.} = 16,67 \text{ nkat}$ erfolgen. Als spezifische Aktivität wird die auf die Gesamtproteinmenge bezogene Aktivität bezeichnet.

Enzymstruktur:

Die LDH ist ein Tetramer (M_r annähernd 140 kDa) und strukturell kein homogenes Enzym. Bei Säugern gibt es zwei unterscheidbare Typen von LDH-Untereinheiten: den Skelettmuskel- (auch Leber-) bzw. M-Typ und den Herzmuskel- bzw. H-Typ. Beide Untereinheiten haben ein ähnliches Molekulargewicht ($M_r \approx 36500$), jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur; der H-Typ enthält einen höheren Anteil saurer Aminosäuren. Deshalb ergeben sich aus der Kombination beider zu Tetrameren fünf Möglichkeiten für eine Enzymzusammensetzung:

LDH₁ (H₄), LDH₂ (H₃M), LDH₃ (H₂M₂), LDH₄ (HM₃), und LDH₅ (M₄).

LDH₁ und LDH₂ sind die dominierenden Komponenten der Herz-LDH, während LDH₄ und LDH₅ im Skelettmuskel bzw. in der Leber dominieren; LDH₃ ist die LDH des lymphatischen Gewebes. LDH₁ bis LDH₅ sind LDH-Isoenzyme.

Bei gleicher oder ähnlicher katalytischer Aktivität unterscheiden sie sich in der Primärstruktur und in den physikalisch-chemischen Eigenschaften wie IP (iso-elektrischer Punkt), pH-Optimum, Substratspezifität, Thermostabilität und Hemmbarkeit sowie grundlegenden kinetischen Eigenschaften und den K_m -Werten.

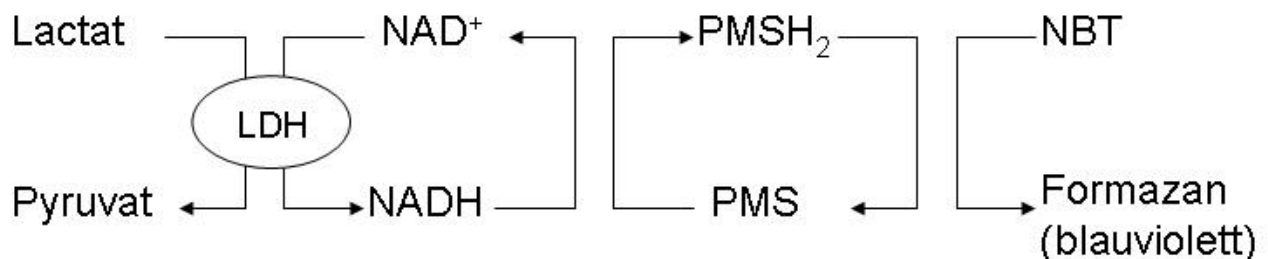
So wird z.B. die LDH des Herzmuskels wird von 1,6 mol/L Pyruvat gehemmt, für die LDH des Skelettmuskels ist diese Konzentration nahezu optimal; LDH₄ und LDH₅ sind kälteempfindlich, LDH₁ und LDH₂ nicht; das pH-Optimum für LDH aus Schweineherz beträgt 7,0 für LDH aus Kaninchenskelettmuskel 6,0.

2.1 Elektrophoretische Trennung der LDH-Isoenzyme im Agarosegel

Versuchsprinzip:

Zur Trennung von Proteinen im elektrischen Gleichspannungsfeld wird die Lage der I.P. ausgenutzt. Mit der Wahl des pH-Wertes des Elektrodenpuffers wird dabei die Ladung der zu trennenden Proteine und damit deren Wanderungsrichtung und Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld bestimmt. Bei einem bestimmten pH-Wert des Elektrodenpuffers und I.P. eines Proteins liegt dieses überwiegend als Anion bzw. Kation vor. Als Trägermedium für die Elektrophorese dient Agarose, ein sulfathaltiges Polysaccharid, das in wässriger Lösung ein Gel ausbildet.

Nach der Elektrophorese werden die Agaroseplatten mit den in der Elektrophorese getrennten LDH-Isoenzymen zu deren Nachweis in einer Lösung inkubiert, die Lactat, NAD^+ , PMS (Phenazinmethosulfat) und NBT (Nitroblautetrazoliumsalz) enthält. Dabei werden unter der katalytischen Wirkung der LDH-Isoenzyme jeweils Lactat und NAD^+ in Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ umgewandelt. Das NADH reduziert dann sekundär über den Elektronenüberträger PMS das NBT zum blauviolett gefärbten schwerlöslichen Formazan, das am Ort des Enzyms im Gelträger ausfällt.



Versuchsdurchführung:

Mit Hilfe einer Stanze werden die Gelträger mit 1 cm breiten Auftragungsschlitz versehen. Anschließend werden 50 μl des Skelettmuskelextraktes (Schweinefleisch vom Schlachthof) bzw. 50 μL eines Herzmuskelextraktes (vom Versuch Biologische Oxidation) mit jeweils 50 μL der im kochenden Wasserbad gelösten und bei 56°C flüssig gehaltenen Agaroselösung in einem Reaktionsgefäß vermischt und jeweils 20 μL dieses Gemisches schnell mit einer Hubkolbenpipette in die Auftragungsschlitz pipettiert.

ACHTUNG! Die Agaroselösung wird bei 35°C wieder fest!

Zur Elektrophorese werden die beiden Elektrodengefäße der Elektrophoreseapparatur mit jeweils 900 mL Puffer pH 8,4 gefüllt, die Agarosegelträger werden mit dem Auftragungsschlitz in Richtung Kathode auf den Kühlblock gelegt und der Kontakt zwischen den Elektrodengefäßen mit puffergetränktem Filterpapierstreifen hergestellt. Nach Anstellen des Kühlwassers und Auflegen des Deckels wird die Elektrophorese mit 20 mA pro Gelträger eine Stunde lang durchgeführt.

Zur Darstellung der Isoenzyme wird 2 Minuten vor Beendigung der Elektrophorese aus 90 mL der Stammlösung I, 0,7 mL der Stammlösung II und 28 mg NAD⁺ die Reaktionslösung hergestellt. Die Lösung wird in ein entsprechendes Gefäß gefüllt und die Gelträger werden in die Lösung gelegt. Die Isoenzyme werden während der Inkubation bei 37°C nach ca. 30 Minuten als blaue Farbzonen sichtbar.

Stammlösung I: Nitroblautetrazoliumchlorid, NaCN, Na-Lactat

Stammlösung II: Phenazinmethosulfat

Auswertung:

Wie unterscheiden sich die Isoenzyme strukturell?

Welche Auswirkung hat das auf ihre Ladung im basischen Milieu?

Was für ein Ergebnis wird erwartet?

2.2 Bestimmung der Anreicherung des Enzyms Lactatdehydrogenase

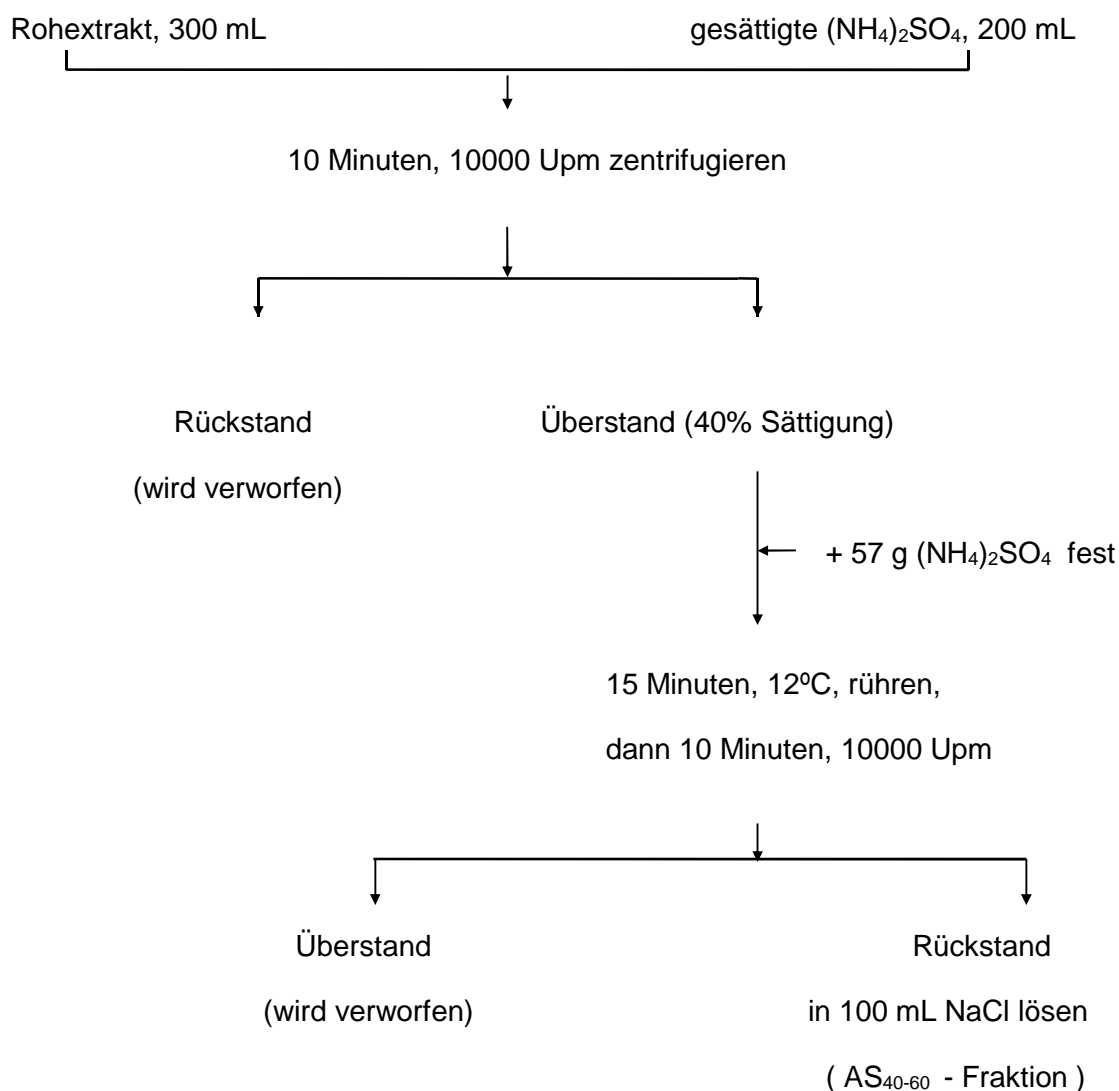
Versuchsprinzip:

Die Anreicherung von LDH aus einem Muskelfleisch-Rohextrakt (Schweinefleisch vom Schlachthof) erfolgt durch **Ammoniumsulfatfällung**. Zur Überprüfung der Anreicherung werden durch Messung des Proteingehalts und der Enzymaktivität die spezifischen Enzymaktivitäten bestimmt. Das Verhältnis der spezifischen Enzymaktivitäten von Ammoniumsulfatfraktion und Rohextrakt ergibt dann den Reinigungsfaktor.

Ammoniumsulfatfällung:

Mit Ammoniumsulfat lassen sich Proteine auf schonende Weise aus Lösungen reversibel ausfällen. Durch das hohe Wasserbindungsvermögen von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wird die Hydrathülle des Proteins entfernt und dadurch seine Löslichkeitsgrenze überschritten. Die dazu notwendige Ammoniumsulfatkonzentration ist von Protein zu Protein unterschiedlich, wodurch sich oft einzelne Komponenten aus komplexen Proteinmischungen selektiv anreichern lassen. **LDH präzipitiert zwischen 40 und 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Sättigung.**

Ihre Anreicherung wurde nach folgendem Schema erreicht:



Versuchsdurchführung:

- a) **Proteinbestimmung**
- b) **Bestimmung der Enzymaktivität**

a) Proteinbestimmung

Prinzip:

Der Proteingehalt der Lösungen wird über die **Biuretmethode** bestimmt. Das Biuretreagenz (im Wesentlichen eine alkalische Tartrat-Kupfersulfat-Lösung) reagiert mit Proteinen unter Blauviolett-färbung. Deren Intensität ist der jeweiligen Proteinkonzentration proportional. Diese Methode erfordert die Aufstellung einer Eichkurve.

Versuchsdurchführung:

Vor der Durchführung der Biuretbestimmung muss die AS₄₀₋₆₀ - Fraktion von dem bei der Fällung teilweise mitgerissenen Ammoniumsulfat befreit werden, da dieses den Biuretttest verfälscht. Dazu wird das Protein mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. (NH₄)₂SO₄ bleibt in Lösung.

0,3 mL der AS₄₀₋₆₀ - Fraktion und 0,3 mL 10% TCA werden in einem Zentrifugenglas (Glas Nr. 3 der untenstehenden Tabelle) vermischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend für 5 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen (Sonderabfall!), die Flüssigkeitsrückstände mit Filterpapier vorsichtig entfernt und der verbleibende Rückstand in 0,5 mL KOH (1 mol/l) vollständig gelöst. Diese 0,5 mL TCA-gefällte AS₄₀₋₆₀ - Fraktion, wird laut nachfolgender Tabelle zur Biuretbestimmung eingesetzt.

Dann wird folgendermaßen pipettiert:

Probe	1	2	3
Rohextrakt	—	0,1 mL	—
AS ₄₀₋₆₀ / TCA-gefällt	—	—	0,5 mL (s.o.)
1 mol/L KOH	0,5 mL	0,5 mL	—
a.dest.	1,0 mL	0,9 mL	1,0 mL
Biuretreagenz	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL

Das Biuretreagenz wird erst nach Abschluss der anderen Pipettierschritte in die Röhren pipettiert, dann werden die Ansätze gut gemischt. Nach 30 Minuten werden die Extinktionen der Proben bei 546 nm am Photometer gemessen. Probe 1 dient als Leerwert.

Auswertung:

Die Extinktionswerte der beiden Proben können über die ausliegende Eichkurve in mg Protein umgerechnet werden. Die Eichkurve wurde unter Verwendung von Rinderserumalbumin erstellt.

Zur Errechnung der spezifischen Enzymaktivität wird aber die Proteinkonzentration in mg/mL benötigt, diese erhält man indem man die absoluten Proteinmengen durch die jeweils eingesetzten Probenvolumina von Rohextrakt bzw. AS-Fraktion dividiert.

	Extinktion	Proteinmenge	eingesetztes V	Proteinkonzentration
Rohextrakt			0,1 mL	
AS-Fraktion			0,3 mL	

b) Bestimmung der Enzymaktivität

Prinzip:

Die Enzymaktivität von LDH wird durch einen **optischen Test** erfasst. Man misst die **Extinktionsabnahme von NADH bei 334 nm**. NAD⁺ und die anderen Komponenten absorbieren bei dieser Wellenlänge nicht. Sowohl NADH als auch Pyruvat sind Substrate für LDH und reagieren stöchiometrisch im Verhältnis 1:1.

Versuchsdurchführung:

Während die Biuret-Proben stehen müssen, werden die Ansätze für die Enzymaktivitätsmessung vorbereitet.

Dazu pipettiert man in die bereitstehenden Küvetten nach folgendem Schema:

Küvette	1	2	3
0,01 mol/L Pyruvat	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
0,1 mol/L Puffer pH 7,4	1,0 mL	0,9 mL	0,9 mL
0,002 mol/L NADH	—	0,1 mL	0,1 mL
a.dest.	1,9 mL	1,8 mL	1,8 mL

Zur Messung werden Rohextrakt bzw. AS₄₀₋₆₀ - Fraktion mit NaCl-Lösung (0,01 mol/L) verdünnt (Verdünnungsfaktor wird vom Betreuer bekannt gegeben). Dann pipettiert man in Küvette 2 genau 0,1 mL des verdünnten Rohextraktes, vermischt schnell und startet gleichzeitig die Uhr. In 30 s-Abständen wird die Extinktion bei 334 nm gemessen. Die

Gesamtmessdauer beträgt 3 min. In gleicher Weise wird der Versuch mit der verdünnten AS₄₀₋₆₀ - Fraktion in Küvette 3 durchgeführt. Küvette 1 dient als Leerwert.

Gemessene Werte Enzymaktivität:

	0 Min.	0,5 Min.	1 Min.	1,5 Min.	2 Min.	2,5 Min.	3 Min.
Rohextrakt							
AS 40/60							

Auswertung:

Die Extinktionswerte beider Proben werden gegen die Zeit aufgetragen. Es ergeben sich zumindest im Anfangsbereich Geraden. Aus der Steigung dieser Geraden ($\Delta E / t$) lässt sich die Enzymaktivität errechnen. (Steigungsdreieck mit $\Delta t = 1$ Minute)

Die Enzymaktivität (z.B. IE) wird gemessen als Konzentrationsabnahme eines Substrats bzw. Konzentrationszunahme eines Produkts pro Zeiteinheit: $IE = \Delta c / t$.

Die Grundlage des optischen Tests bildet das Lambert-Beer'sche Gesetz.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

E: Extinktion

d: Schichtdicke in cm

ε : molarer Extinktionskoeffizient, ε_{334} für NADH = $6,18 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bzw. $6,18 \text{ mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Dieser Wert gibt an, dass z.B. die photometrische Messung einer NADH- Lösung (1 mol/L) bei 334 nm und eine Schichtdicke von 1 cm eine Extinktion von 6,18 ergibt.

Die Konzentration (c) errechnet sich aus der Extinktion durch Umformung von (1)

$$c = \quad (2)$$

Durch Einsetzen in Gleichung (2) erhält man:

$$IE = \frac{\Delta c}{t} = \frac{\Delta E}{t \cdot \varepsilon \cdot d}$$

Bei der Berechnung der Enzymaktivität pro 1 mL Enzymlösung sind die Verdünnungsfaktoren F_1 und F_2 zu berücksichtigen, die sich aus der Probenvorbereitung und dem Testansatz ergeben.

Verdünnungsfaktoren:

$$F_1 = \frac{x \text{ ml Endvolumen der Verdünnung}}{0,1 \text{ ml Rohextrakt bzw. AS}_{40-60} \text{ - Fraktion}}$$

$$F_2 = \frac{3,0 \text{ ml Gesamtvolumen des Testansatzes}}{0,1 \text{ ml zum Test eingesetzte Menge Enzymverdünnung}}$$

Daraus ergibt sich:

$$\text{IE/ ml Ausgangsprobe} = \frac{\Delta E}{t \cdot \epsilon \cdot d} \cdot F_1 \cdot F_2$$

Konstante Faktoren: $t = 1$ Minute; $\epsilon = 6,18 \text{ mL} \times \mu\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; $d = 1 \text{ cm}$, $F_2 = 30$)

Durch Einsetzen dieser Faktoren erhält man folgende Gleichung:

$$\text{IE/ ml} = \Delta E \cdot \frac{F_1 \cdot 30}{6,18} \quad [\mu\text{mol/ min/ ml} = \text{IE/ ml}]$$

Die Enzymaktivität ist in nkat umzurechnen.

Die spezifische Enzymaktivität errechnet sich nach folgender Beziehung (siehe auch Einleitung):

$$\text{spez. IE} = \text{IE/ mg Protein} = \frac{\text{IE/ ml}}{\text{mg Protein/ ml}} \quad [\text{IE/ mg}]$$

Die Enzymaktivität und die Enzymkonzentration sind bei Substratüberschuss (wie hier gegeben) proportional zueinander. Somit ist die spezifische Enzymaktivität ein Maß für den Anteil der LDH an der Gesamtproteinmenge.

Das Verhältnis der spezifischen Enzymaktivitäten von AS₄₀₋₆₀ - Fraktion zu Rohextrakt ergibt den Reinigungsfaktor, der durch die Ammoniumsulfatfällung zu erzielen ist.

Der Reinigungsfaktor gibt also an, um welchen Faktor der Anteil der LDH am Gesamtprotein in der AS₄₀₋₆₀ - Fraktion größer ist als im Rohextrakt.

Gesamtauswertung:

	Enzymaktivität		Proteingehalt [mg/mL]	spez. Enzymaktivität	
	[IE/mL]	[nkat/mL]		[IE/mg]	[nkat/mg]
Rohextrakt					
AS ₄₀₋₆₀ -Fraktion					

Reinigungsfaktor:	
-------------------	--

3 KOHLENHYDRATE

3.1 Isolierung von Glykogen aus Leber-Säurehydrolysat und Nachweis der Glukose

Glykogen ist das hochmolekulare Reservekohlenhydrat tierischer Zellen. Bei hohem Kohlenhydratangebot in der Nahrung wird dieser Speicher aufgefüllt (Glykogen-Synthese), bei Mangel bzw. Absinken des Glukosespiegels im Blut wird Glykogen zu Glukosephosphaten bzw. zu freier Glukose abgebaut (Glykogenolyse). Die Leber enthält etwa 5-10 %, Muskel ca. 1 % des Organgewichts an Glykogen. Nur in der Leber jedoch erfolgt ein Abbau bis zur freien Glukose verbunden mit einer Freisetzung ins Blut. Die Leber ist daher der Lieferant für Blutglukose.

Eine Reihe von Zellen und Geweben (z.B. Erythrozyten, Gehirnzellen) können aus unterschiedlichen Gründen Fettsäuren oder Aminosäuren zur Energiegewinnung nicht verwerten und sind auf Glukose als Substrat angewiesen. Daher wird die Einhaltung eines konstanten Blutglukosespiegels über verschiedene hormonelle Regelvorgänge genau kontrolliert.

Der intrazelluläre Abbau der Glukose erfolgt über einen in allen Zellen gleichartigen Prozess, die Glykolyse. Dabei wird Glukose in Pyruvat umgewandelt. Wie dieses Produkt weiter verwertet wird, hängt von der Art der Zellen und ihren Lebensbedingungen (aerob, anaerob) ab.

Versuchsprinzip:

Lebergewebe kann in heißer konzentrierter Lauge fast vollständig gelöst werden. Dabei gehen Proteine und Glykogen in Lösung. Durch Zugabe von Ethanol wird Glykogen unlöslich und kann abzentrifugiert werden, während unter diesen Bedingungen die Proteine gelöst bleiben. Durch mehrfaches "Umfällen" kann man so das ausgefallene Glykogen von allen anderen Leberbestandteilen abtrennen.

In Polysacchariden wie Glykogen, Stärke oder Cellulose sind die monomeren Unter-einheiten (Monosaccharide) über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft. Solche Bindungen können durch Säuren hydrolysiert werden, und im Hydrolysat kann man die dabei entstandenen Monosaccharide nachweisen, z.B. durch deren reduzierende Wirkung.

Versuchsdurchführung:

Leberstücke (Schweineleber, Schlachthof) von ca. 1 g Gewicht werden in einem Zentrifugenglas mit 4,0 mL 30 %iger KOH versetzt und im kochenden Wasserbad erhitzt, bis sie sich völlig gelöst haben. Vorsicht: 30 %ige KOH ist stark ätzend.

ACHTUNG! Schutzbrille! Gläser stets mit einer Klammer halten!

Die dunkelrote, leicht trübe Lösung wird mit 10 mL 95% igem Ethanol versetzt und nochmals kurz zum Sieden erhitzt. Gut umrühren!

Das Glas unter fließendem Wasser abkühlen, dabei fällt das unlösliche Glykogen aus und wird abzentrifugiert (5 Minuten, 3000 Upm).

Der Überstand wird vorsichtig abgegossen, der Niederschlag nochmals mit 10 mL 95 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert.

Der Überstand wird abgegossen, der Rückstand der Hydrolyse unterworfen.

Hydrolyse:

Der Glykogen-Niederschlag wird mit 2 mL H_2SO_4 (2,5 mol/L) versetzt und 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt. Dabei werden die glykosidischen Bindungen gespalten und Mono- bzw. Oligosaccharide freigesetzt. Nach dem Abkühlen versetzt man den meist noch dunkel gefärbten Ansatz mit 2 Tropfen des Indikators Phenolrot und neutralisiert ihn durch tropfenweise Zugabe von 30 %iger NaOH. (Vorsicht! Starke Erwärmung!). Anschließend wird der Ansatz filtriert.

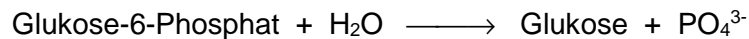
Glukosenachweis:

1 mL der neutralisierten und filtrierten Lösung wird mit 1 mL "Benedict'scher Lösung" versetzt und 2 Minuten vorsichtig erhitzt. Benedict'sche Lösung enthält CuSO_4 , das durch Na-Citrat in alkalischer Lösung komplex gebunden vorliegt. Beim Erhitzen kommt es durch die reduzierende Wirkung der freien glykosidischen Gruppen über eine Endiolisierung zur Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ .

Dabei geht die blaue Farbe in ein schmutziges grün-braun über, und schließlich fällt orangerotes Cu_2O aus.

3.2 Bestimmung der Glukose-6-Phosphatase-Aktivität in einem Leberextrakt

Das Enzym Glukose-6-Phosphatase katalysiert die hydrolytische Spaltung von Glukose-6-Phosphat in freie Glukose und Phosphat



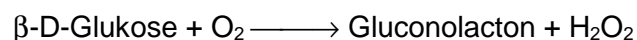
Das Enzym kommt vor allem in der Leber vor. Es fehlt in der Skelettmuskulatur. Die Leber kann mit Hilfe dieses Enzyms aus Glukose-6-Phosphat, das aus dem Glykogenabbau oder der Gluconeogenese stammt, Glukose freisetzen und an das Blut abgeben.

Versuchsprinzip:

Eine gepufferte Lösung von Glukose-6-Phosphat wird mit einem Leberextrakt (Schweineleber, Schlachthof) bei 37°C inkubiert. In definierten zeitlichen Abständen werden Proben entnommen und in kalte Trichloressigsäure (5%) pipettiert. Dadurch wird die Enzymreaktion abgestoppt. Das gefällte Protein wird abzentrifugiert und im Überstand wird die während der Reaktionszeit gebildete freie Glukose bestimmt. Aus den ermittelten Werten kann die Aktivität des Enzyms berechnet werden.

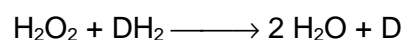
Die Glukosebestimmung erfolgt enzymatisch mit der Glukoseoxidase-Peroxidase-(GOD/POD)-Methode. Glukose wird durch die GOD zu Gluconolacton dehydriert und der Wasserstoff wird auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dabei entsteht pro Molekül Glukose ein Molekül Wasserstoffperoxid.

GOD



Das Gluconolacton wird spontan zu Gluconsäure hydrolysiert. Wasserstoffperoxid oxidiert in einer durch Peroxydase (POD) katalysierten Reaktion den Wasserstoffdonator ABTS (2'-Azino-di-3-ethylbenzthiozolin-sulfonsäure(6)-diammoniumsalz) zu einem grünen Farbstoff.
(D = Donator)

POD



Die Intensität des Farbstoffs ist der Glukosekonzentration proportional. Die Extinktion des Farbstoffs wird bei 578 nm gemessen.

Versuchsvorbereitung:

Spitze Zentrifugengläser werden mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 beschriftet. Sie werden für die Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) verwendet ("TCA-Röhrchen").

8 runde Zentrifugengläser werden mit L (Leerwert), S (Standard) und 0, 2, 4, 6, 8 und 10 beschriftet. Sie werden für die Glukosebestimmung verwendet ("Glukose-Röhrchen").

Ein Reagenzglas wird mit G beschriftet. Es ist für den Leberextrakt und das Substrat Glukose-6-Phosphat vorgesehen.

Versuchsdurchführung:

In die TCA-Röhrchen werden je 1 mL 5% TCA pipettiert und die Röhrchen werden in ein Eisbad gestellt.

In das Reagenzglas G werden 2 mL der eisgekühlten Glukose-6-Phosphat-Lösung (G-6-P) und 100 µL Leberextrakt pipettiert, gemischt und in das Eisbad zurück gestellt. Aus diesem Ansatz werden sofort 200 µL in das TCA-Röhrchen 0 pipettiert, geschüttelt und als Nullprobe im Eisbad stehen gelassen.

Anschließend wird die Glukose-6-Phosphatasereaktion dadurch gestartet, dass man das Reagenzglas G in ein Wasserbad von 37°C stellt. Stoppuhr starten!

Nach exakt 2, 4, 6, 8 und 10 Minuten werden aus der Probe G jeweils 200 µL in die TCA-Röhrchen 2, 4, 6, 8 und 10 pipettiert, geschüttelt und im Eisbad stehen gelassen.

Nach Abschluss der Inkubationszeit werden alle TCA-Röhrchen 5 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert.

Nun wird nach folgendem Schema pipettiert:

	Leerwert	Standard	0	2	4	6	8	10
Reagenzlösung*	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL
Standard		50µL						
TCA-Überstand	-	-	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL
H ₂ O _{dest.}	50µL							

(*enthält GOD, POD, ABTS, Phosphatpuffer, pH 7,0)

Alle Gläschen werden gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird die Extinktion aller Proben bei einer Wellenlänge von 578 nm gegen den Leerwert L gemessen.

Berechnung:

Der Extinktionswert der Probe 0 (Nullprobe) entspricht der Konzentration an freier Glukose im Leberextrakt vor Beginn der Phosphatase-Reaktion. Die Extinktionswerte für die Proben 2, 4, 6, 8 und 10 werden korrigiert, indem von jedem Wert der Extinktionswert der Probe 0 abgezogen wird (ergibt E_{kor.}). Tragen Sie die korrigierten Werte ebenfalls in die Tabelle ein.

Mit den korrigierten Werten wird ein Diagramm erstellt.

Ordinate: Extinktion Abszisse: Reaktionszeit

Zeichnen Sie durch die erhaltenen Werte eine Gerade, die die Werte möglichst optimal erfüllt und die durch den Nullpunkt geht. Aus dieser Geraden kann die Enzymaktivität in 1 mL Enzymextrakt, angegeben in Internationalen Einheiten (IE = $\mu\text{mol}/\text{min}$), errechnet werden:

$$\text{IE/ ml} = \frac{\Delta E}{t} \cdot \frac{c_{\text{St}}}{E_{\text{St}}} \cdot F_1 \cdot F_2$$

ΔE korrigierte Extinktion $E_{\text{kor.}}$ in einer Inkubationszeit t von 1 Minute

c_{St} Konzentration des Glukosestandards = 1 mg/mL = 5,55 mmol/L

E_{St} Extinktion des Glukosestandards

F_1 Verdünnungsfaktor, der sich aus der Verdünnung des Leberextrakts und der zur Inkubation eingesetzten Menge Enzymansatz G ergibt.

F_2 Faktor, der sich durch das Verhältnis von Ansatzvolumen nach TCA-Fällung und der Menge ergibt, die zur Glukosebestimmung eingesetzt wird.

$$F_1 = \frac{0,1\text{ml} + 2,0\text{ml}}{0,2\text{ml}} = 10,5$$

$$F_2 = \frac{0,2\text{ml} + 1\text{ml}}{0,05\text{ml}} = 24$$

Machen Sie sich das Zustandekommen der Formel klar!

Geben Sie die Enzymaktivität in Mikrokatal (μkat) an.

3.3 Untersuchungen zur optischen Aktivität von Kohlenhydraten

Alle Monosaccharide (Ausnahme: Dihydroxyaceton) besitzen eines oder mehrere asymmetrische (chirale) Kohlenstoffatome. Sie treten daher in Stereoisomeren auf, die eine unterschiedliche optische Aktivität besitzen. Dabei unterscheidet man zwischen Enantiomeren, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten, und Diastereomeren.

Solche optische Aktivität kann man mit einem Polarimeter bestimmen. Dabei wird die Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes nach Passieren der optisch aktiven Substanz gedreht, entweder nach rechts (+) oder links (-).

Diese optische Aktivität misst man als spezifische Drehung α :

$$[\alpha]_D = \frac{\text{Drehung in Grad}}{\text{Schichtdicke} \times \text{Konzentration}}$$

Aufgabe ist es nun, zuerst die spezifische Drehung α von D-Glucose, D-Fructose und Saccharose zu bestimmen. Die praktische Durchführung am Polarimeter übernimmt der Assistent.

Dazu werden jeweils die einzelnen Lösungen in die 20 cm lange Küvette gegeben. Es ist darauf zu achten, dass sich bei der Messung keine Luftblasen im Strahlungsgang befinden. Nach dem Einlegen der Küvette kann nun sofort die optische Aktivität in Grad gemessen werden.

D-Glucose: _____

D-Fructose: _____

Saccharose: _____

Zu der Saccharose-Lösung wird nun 0,2 mL einer Invertase-Lösung gegeben. Invertase kann enzymatisch Saccharose zu Glucose und Fructose spalten.

Messen Sie nun alle 2 Minuten die optische Aktivität.

Warum ändert sich diese mit der Zeit?

4 LIPIDE

4.1 Bestimmung von D-3-Hydroxybutyrat im Rinderblut (vom Schlachthof)

D-3-Hydroxybutyrat (β -Hydroxybutyrat) wird neben Acetoacetat und Aceton - chemisch nicht korrekt - zu den Ketonkörpern gerechnet. Eine pathologisch gesteigerte Ketonkörper-Produktion (Ketogenese) ist bei Hochleistungsmilchkühen eine der wichtigsten und häufigsten Stoffwechselkrankheiten. Sie wird als Ketose oder Acetonämie bezeichnet.

Normalwerte beim Rind: 0,2 – 0,5 mmol/L Blut

Subklinische Ketose: $\geq 1,5$ mmol/L Blut

Werte bei klinisch manifester Ketose: $\geq 2,6$ mmol/L Blut

A. Schnellbestimmung von β -Keton (D-3-Hydroxybutyrat) im Blut

Versuchsprinzip:

Schnelltestverfahren mittels Keton-Teststreifen und Schnellmessgerät (Precision Xceed Fa. Abbott).

Versuchsdurchführung (s. auch Gerätebeschreibung):

Achtung: Vor der Messung erfolgt die Kalibrierung des Messgeräts durch einen speziellen Kalibrationsstreifen (Chargennummer beachten)!

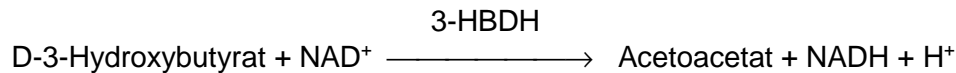
Vorgelegt wird ein Tropfen Rinder-Vollblut (Schlachthofmaterial, gerinnungsgehemmt)

- Entnahme des β -Keton-Teststreifens aus der Verpackung
- Einstecken des Streifens in das Gerät (schwarze Linien nach oben), Gerät schaltet sich ein
- Wenn das Symbol zum Probenauftrag erscheint, kann Blut auf das weiße Ende des Teststreifens appliziert werden
- Messvorgang beginnt automatisch, der Streifen wird nach dem Signalton aus dem Blut gezogen (Countdown-Anzeige zeigt Dauer des Messvorgangs an)
- Nach Ende des Messvorgangs (Signal, Wertanzeige) wird der Wert abgelesen und notiert

B. Enzymatische Bestimmung von D-3-Hydroxybutyrat im Blut (Testbesteck Roche)

Versuchsprinzip:

D-3-Hydroxybutyrat wird in der durch die 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (3-HBDH) katalysierten Reaktion durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺) zu Acetoacetat oxidiert. Dabei wird NAD⁺ zu NADH reduziert:



Die gebildete Menge an NADH ist der D-3-Hydroxybutyratkonzentration äquivalent. NADH ist die Messgröße. Die Extinktion von NADH wird bei einer Wellenlänge von 334 nm im Fotometer gemessen.

Versuchsdurchführung:

Lösungen:

Probe enteiweisstes Blut (aus Schlachthofmaterial), mit Carbonatpuffer auf pH 9,5 eingestellt

Lösung 1 NAD⁺ (25 mmol/L)

Lösung 2 3-HBDH (5 mg/mL)

Zentrifugenglas Nr.	Leerwert	1	2	3
Probe	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Lösung 1	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Lösung 2	—	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL
mischen, 30 Minuten ins 37°C-Wasserbad stellen, sofort gegen Leerwert messen				

Berechnung:

Die D-3-Hydroxybutyratkonzentration (c) im Blut wird mittels dem Lambert-Beer'schem Gesetz berechnet:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

ε: molarer Extinktionskoeffizient, ε₃₃₄ für NADH = 6,18 L • mmol⁻¹ • cm⁻¹ bzw.
6,18 mL • μmol⁻¹ • cm⁻¹

d: Schichtdicke in cm

E: Extinktion

4.2 Enzymatische Spaltung von Triacylglycerinen durch Pankreaslipase

Die Pankreaslipase zeichnet sich durch ihre Stellungsspezifität aus. Von ihrem Substrat, den Triacylglycerinen der Nahrung, spaltet sie endständige Fettsäuren ab. Wenn Pankreaslipase längere Zeit auf die Triacylglycerine der Nahrung einwirkt, entstehen vorwiegend Freie Fettsäuren und 2-Monoacylglycerine.

Versuchsprinzip:

Eine Ölemulsion (Triacylglycerin) wird in Gegenwart von Galle mit Pankreaslipase inkubiert. Nach der Inkubation werden die Lipide extrahiert und mit Hilfe von Referenzsubstanzen dünnschichtchromatographisch identifiziert.

Versuchsdurchführung:

In ein 25 mL Zentrifugenglas werden pipettiert:

Lipase-Suspension	1,0 mL
Ammoniumchloridpuffer (pH 8,0; 0,05 mol/L)	2,0 mL
CaCl ₂ (0,1 mol/L)	2,0 mL
Natriumtaurocholat (10%)	0,4 mL
Olivenölemulsion	0,4 mL

Das Zentrifugenglas wird mit einem Stopfen verschlossen, der Inhalt gut durchmischt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden 2 mL H₂SO₄ (0,5 mol/L) und 4 mL Chloroform (CHCl₃) aus der Dispensette dazugegeben und 2 Minuten geschüttelt. Anschließend wird 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen/min (Upm) zentrifugiert. Die überstehende wässrige Phase wird mit einer Pasteurpipette unter Vakuum vorsichtig abgesaugt. Die Chloroformphase (Fettextrakt) wird in ein sauberes Zentrifugenglas filtriert und dünnschichtchromatographisch untersucht.

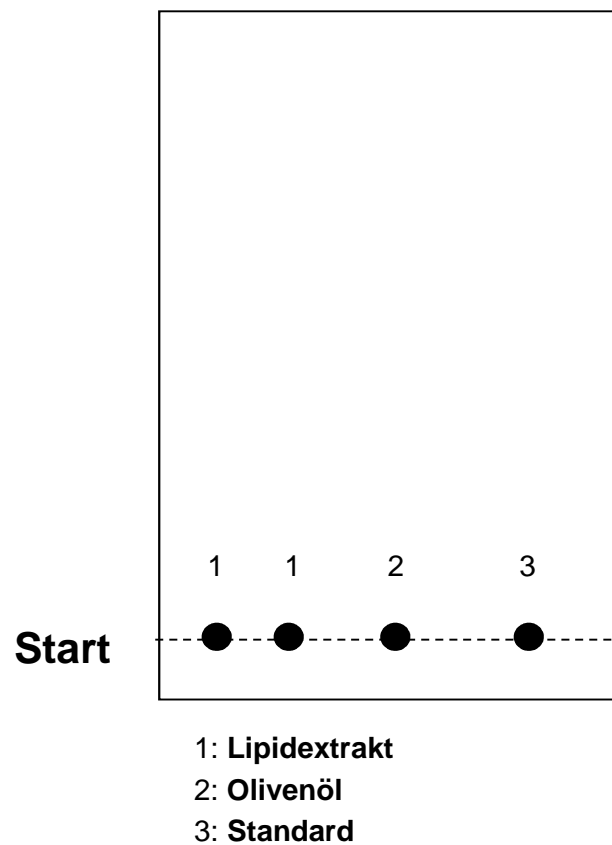
Dünnschichtchromatographie:

Auf die mit Kieselgel beschichteten Folien werden 2 cm vom unteren Rand entfernt nebeneinander zwei einzelne Tropfen des Lipidextraktes aufgetragen. Als Vergleichssubstanz werden je ein Tropfen einer etherischen Olivenöllösung und eines Standards aufgetragen. Die Platten werden 45 Minuten lang in dem folgenden Fließmittel

Petrolether : Diethylether : Eisessig= 80 : 20 : 1 (v/v/v) entwickelt.

Zur Sichtbarmachung der Lipidflecken werden die Platten 15 Minuten in eine mit Joddämpfen gesättigte Chromatographiekammer gestellt.

Abbildung 1: Auftragsschema bei Dünnschichtchromatographie



4.3 Bestimmung der Peroxidzahl eines Fettes

Die Peroxidzahl (POZ) gibt die Anzahl mg peroxidisch gebundenen Sauerstoffs an, die in einem kg Fett enthalten ist. Sie ist ein Maß für die Verderbenheit von Nahrungsfetten mit ungesättigten Fettsäure-Resten. Die Bildung des Fettsäure-Hydroperoxids erfolgt durch eine Radikalketten-Reaktion.

Versuchsprinzip:

Lipidperoxide oxidieren Jodidionen zu elementarem Jod. Die Konzentration des entstandenen Jods wird titrimetrisch mit Natriumthiosulfat bestimmt.

Versuchsdurchführung (Reihenfolge unbedingt einhalten):

- (1) 50 mL H₂O_{dest.} werden in einen Messzylinder gefüllt.
- (2) Dazu gibt man ca. 1 mL Stärkelösung als Indikator.
- (3) In einen Jodzählkolben wird 1 mL Fettstammlösung (enthält 0,2 g Fett pro mL Chloroform) mit einer 1 mL-Vollpipette pipettiert. Dazu gibt man ca. 25 mL Chloroform/Eisessig (1/1), die man mit einem Messzylinder abmisst.
- (4) Anschließend wird die Bürette mit 0,002 mol/L Natriumthiosulfat aufgefüllt und der Meniskus auf null eingestellt.
- (5) In den Jodzählkolben pipettiert man 0,6 mL einer 50% Kaliumjodidlösung, verschließt den Kolben sofort, startet die Stoppuhr und schüttelt den Kolben kräftig exakt 1 Minute lang.
- (6) Dann gießt man das abgemessene Wasser mit der Stärkelösung in den Jodzählkolben und titriert unverzüglich ohne Unterbrechung und unter kräftigem Schütteln bis zur Farblosigkeit.

Berechnung:

$$POZ = \frac{a \cdot c \cdot 1000 \cdot 16}{E}$$

a = verbrauchte mL Natriumthiosulfatlösung

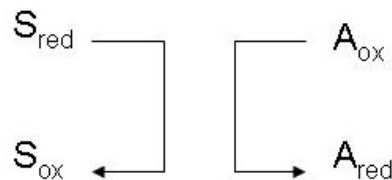
c = Konzentration der Natriumthiosulfatlösung

E = Einwaage in g

5 BIOLOGISCHE OXIDATION

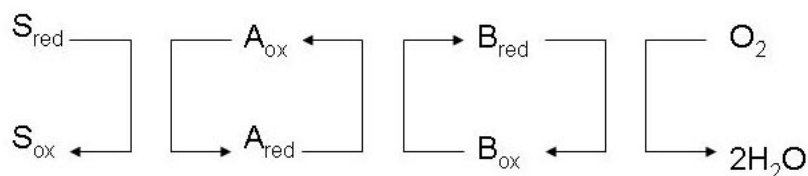
Oxidations-Reduktions-Reaktionen sind im lebenden Organismus die Hauptquelle für chemisch verwertbare Energie. Unter aeroben Bedingungen (in Anwesenheit von O_2) werden die Kohlenstoffatome der Substrate letztlich zu CO_2 , die Wasserstoffatome zu H_2O oxidiert.

Eine Oxidations-Reduktions-Reaktion schreibt man:



Die Schreibweise bedeutet: Vom reduzierten Substrat S_{red} werden Elektronen auf A_{ox} übertragen. Dabei wird S_{red} zu S_{ox} oxidiert und A_{ox} zu A_{red} reduziert. Da Reduktions- und Oxidationsvorgang stets gekoppelt sind, spricht man von Redox-Reaktionen; die beteiligten Enzyme heißen Oxidoreduktasen. Bei gleicher Konzentration bestimmen die Redoxpotentiale der Partner, welche Richtung der Elektronenfluss nimmt, d.h. in welcher Richtung die Reaktion spontan abläuft.

Mehrere Redox-Reaktionen können zu einer Elektronentransport-Kette verbunden sein, z.B.:



Die Redoxpotentiale werden von links nach rechts positiver; die Elektronen werden auf den Sauerstoff übertragen. In Zellen aerob lebender Organismen werden die Elektronen des Substrat-Wasserstoffs in der Atmungskette ebenfalls auf Sauerstoff übertragen. Der Vorgang findet in den Mitochondrien an Enzymsystemen statt, die in der inneren Membran lokalisiert sind

Die Redoxpotentiale werden von links nach rechts positiver; die Elektronen werden auf den Sauerstoff übertragen. In Zellen aerob lebender Organismen werden die Elektronen des Substrat-Wasserstoffs in der Atmungskette ebenfalls auf Sauerstoff übertragen. Der Vorgang findet in den Mitochondrien an Enzymsystemen statt, die in der inneren Membran lokalisiert sind.

Die Substrate mit stark negativen Redoxpotentialen, die die Elektronen an die Atmungskette liefern, stammen aus dem Intermediärstoffwechsel (Citratzyklus, Aminosäureabbau, Glykolyse, Fettsäureabbau).

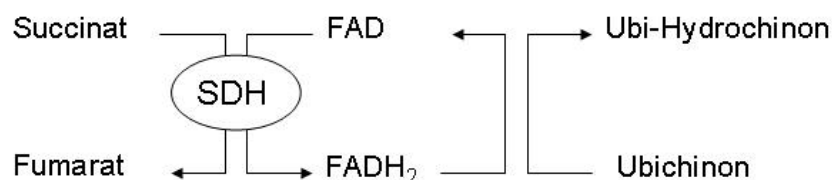
Die Elektronentransportkette in der Mitochondrienmembran ist an die Synthese energiereicher Phosphate gekoppelt (oxidative Phosphorylierung).

5.1 Gewinnung von Mitochondrien aus Herzmuskel und Messung der Succinat-Dehydrogenase-Reaktion

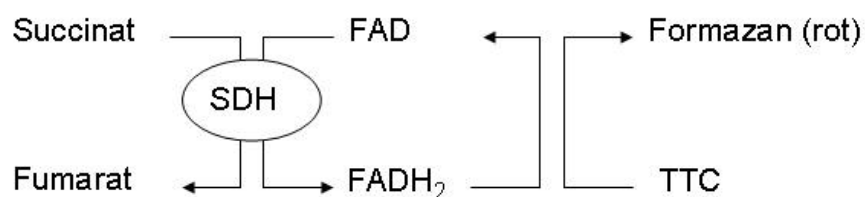
Versuchsprinzip:

Zur präparativen Gewinnung von Mitochondrien muss man Zellen oder Gewebe zerstören. In unserem Versuch geschieht das mit Hilfe eines Homogenisators, einem Teflon- oder Glasstempel, der eng in einem Glaszylinder geführt wird. Zellen, die durch Bewegen des Stempels zwischen Stempel und Glaswand geraten, werden durch die auftretenden Scherkräfte zerrissen. Das Homogenat wird durch niedertouriges Zentrifugieren von groben Zelltrümmern und den Zellkernen befreit. Die im Überstand befindlichen Mitochondrien sedimentieren bei höherer g-Zahl. Sie stellen eine Roh-Mitochondrien-Fraktion dar, die noch durch Membranbestandteile der Zellen verunreinigt ist. Wir verwenden diese Rohfraktion zur Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität.

Succinat wird durch Succinat-Dehydrogenase (SDH), ein FAD-abhängiges Enzym, zu Fumarat dehydriert. Das FAD übernimmt die Wasserstoffe und überträgt sie in vivo auf Ubichinon.



In unserem Versuch bieten wir dem Enzym einen künstlichen Elektronen- und Wasserstoffakzeptor an, das Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). TTC geht bei Reduktion in eine Substanz über, die man Formazan nennt und die intensiv rot gefärbt ist.



Bestimmung der Substratabhängigkeit der Enzymreaktion:

Die Messung der Extinktion des roten Farbstoffs erlaubt die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Bei welcher Substratkonzentration bestimmt man die Enzymaktivität?

Versuchsdurchführung:

Gewinnung von Mitochondrien: Hühnerherz (ca. 0,3 g vom Schlachthof) wird mit der Schere in möglichst kleine Stückchen geschnitten und mit 10 mL einer gepufferten isotonen Saccharoselösung in den Homogenisator überführt. Unter Eiskühlung wird von Hand so lange homogenisiert, bis praktisch keine Gewebeteile mehr zu erkennen sind. Eine solche Behandlung zerstört den größten Teil der Zellen. Das Homogenat wird 10 Minuten bei 1000 g (3000 Upm) zentrifugiert. Der trübe Überstand wird abgenommen und nochmals bei 8000 g zentrifugiert; jetzt sedimentieren die Mitochondrien als braune Schicht. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in Phosphatpuffer (0,1 mol/L) pH 7,0 suspendiert. Diese Mitochondrien-Fraktion wird als Enzymquelle verwendet.

6 Zentrifugengläser werden mit 1-6 beschriftet und es wird nach folgendem Schema pipettiert:

Glas Nr.	1	2	3	4	5	6
Puffer-Lösung	1 mL	—	—	—	—	—
0,06 mmol/L Succinat	—	1 mL	—	—	—	—
0,15 mmol/L Succinat	—	—	1 mL	—	—	—
0,30 mmol/L Succinat	—	—	—	1 mL	—	—
0,60 mmol/L Succinat	—	—	—	—	1 mL	—
1,20 mmol/L Succinat	—	—	—	—	—	1 mL

Nun wird in alle Gläser pipettiert:

je 0,3 mL TTC-Lösung

je 0,1 mL Mitochondriensuspension

Gut mischen und die Gläser in ein **37 °C-Wasserbad** stellen.

Nach 20 Minuten Inkubation die Proben **ins Eisbad** stellen und in alle Gläser ca. 1 mL **eiskalte** 10%ige Trichloressigsäure (TCA) pipettieren. Man arbeitet mit einer 10 mL Messpipette, da es auf Schnelligkeit ankommt! Gut mischen und die Gläser weitere 10 Minuten im Eisbad belassen. Nun pipettiert man in jedes Glas **genau** 2,0 mL Ethylacetat, verschließt die Gläser mit Silikonstopfen und **schüttelt kräftig**. Dabei geht der wasserunlösliche Farbstoff in die organische Phase über. Die unmischbaren Phasen werden

durch Zentrifugation (5 min, 3000 Upm) getrennt und die oberen Phasen werden vorsichtig mit einer Pasteurpipette in trockene Zentrifugengläser überführt. Es wird im Fotometer bei 492 nm gegen Probe 1 gemessen.

Zeichnen Sie ein Diagramm:

- **Abszisse** : **Substratkonzentration (mmol/l)**

- **Ordinate**: **E_{492}**

Was bedeutet die Kurve?

5.2 Aufnahme der Absorptionsspektren von oxidiertem und reduziertem Cytochrom C

Versuchsprinzip:

Das Hämoprotein Cytochrom C ist ein Elektronenüberträger. Es wird in der Atmungskette von Cytochrom C-Oxidase oxidiert. Cytochrom C besitzt in seiner reduzierten Form ein anderes Absorptionsspektrum als in der oxidierten Form.

Versuchsdurchführung:

Die Lösungen sind bei gleicher Temperatur aufzubewahren. Das Fotometer ist bei einer Wellenlänge von 500 nm gegen eine mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gefüllte Küvette abzugleichen. Für die Messung werden 2 mL Cytochrom C-Lösung (40 $\mu\text{mol/L}$) in die Messküvette pipettiert. Man liest die Extinktion der Lösung bei 500 nm ab und stellt nachfolgend die Extinktionen in Schritten von 10 nm bis zu einer Wellenlänge von 600 nm fest.

(Achtung ! Bei jeder neu eingestellten Wellenlänge muss ein neuer Abgleich gegen eine mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gefüllte Küvette erfolgen!)

Zur Aufnahme des Absorptionsspektrums von reduziertem Cytochrom C werden zum Küvetteninhalt (Cytochrom C-Stammlösung) 20 μl Ascorbinsäure (20 mmol/l) pipettiert. Nach gründlichem Mischen wird die Reduktion abgewartet, die nach ca. 20 Minuten beendet ist. Dann verfährt man wie oben beschrieben.

Auswertung:

Die Absorptionsspektren von Cytochrom C (oxidierte Form und reduzierte Form) sind aufzunehmen und auf Millimeterpapier zu zeichnen.

Die Absorptionsmaxima sind anzugeben.

5.3 Untersuchung der Cytochrom C-Oxidase

Versuchsprinzip:

Cytochrom C-Oxidase ist das Enzym, das die letzte Stufe der Atmungskette katalysiert. Das Enzym überträgt Elektronen, die es vom Cytochrom C übernimmt, auf molekularen Sauerstoff. Cytochrom C-Oxidase kann durch CN^- -Ionen gehemmt werden (Giftwirkung von Blausäure!)

Versuchsdurchführung:

Die Messung wird im Eppendorf-Fotometer mit 1 cm-Küvetten durchgeführt (Vergleiche vorherige Aufgabe). **Es wird gegen eine mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gefüllte Küvette gemessen.**

In die Küvette pipettiert man 2 mL Cytochrom C-Lösung und die Startextinktion wird abgelesen. Nach Zugabe von 0,2 mL Ascorbinsäure wird die Extinktion im Minuten-Abstand abgelesen, bis nach ca. 6 Minuten ein konstanter Wert erreicht ist.

Nach Zugabe von 0,1 mL Herzmuskelextrakt (Enzymquelle) werden die Extinktionswerte in Minutenabständen abgelesen, bis nach ca. 8 Minuten wieder ein Endwert erreicht ist. Erst jetzt ist das Gleichgewicht zwischen von Cytochrom C-Oxidase katalysierter Oxidation und Reduktion durch Ascorbinsäure erreicht.

Die weitere Zugabe von 0,05 mL Ascorbinsäure verschiebt dieses Gleichgewicht nur geringfügig: 6 x in Minutenabständen ablesen. Nach Zugabe von 0,02 mL KCN (0,1 mol/l) wird **6 x** im Minutenabstand die Extinktion festgestellt. Am Ende der Messung liegt Cytochrom C durch den Ascorbatüberschuss wieder vollständig reduziert vor.

Cytochrom C-Oxidase-Extinktionen (550 nm)

2 mL Cytochrom C	0'							
0,2 mL Ascorbinsäure	1'	2'	3'	4'	5'	6'		
0,1 mL Herzmuskelextrakt	7'	8'	9'	10'	11'	12'	13'	14'
0,05 mL Ascorbinsäure	15'	16'	17'	18'	19'	20'		
0,02 mL KCN	21'	22'	23'	24'	25'	26'		

6 NUKLEINSÄUREN

Nukleinsäuren sind Polynukleotide, wobei jedes Nukleotid sich aus einem Phosphat, einer Ribose (RNA) oder Desoxyribose (DNA) und einer Purin- oder Pyrimidin-Base zusammensetzt. Die einzelnen Nukleotide sind durch Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft.

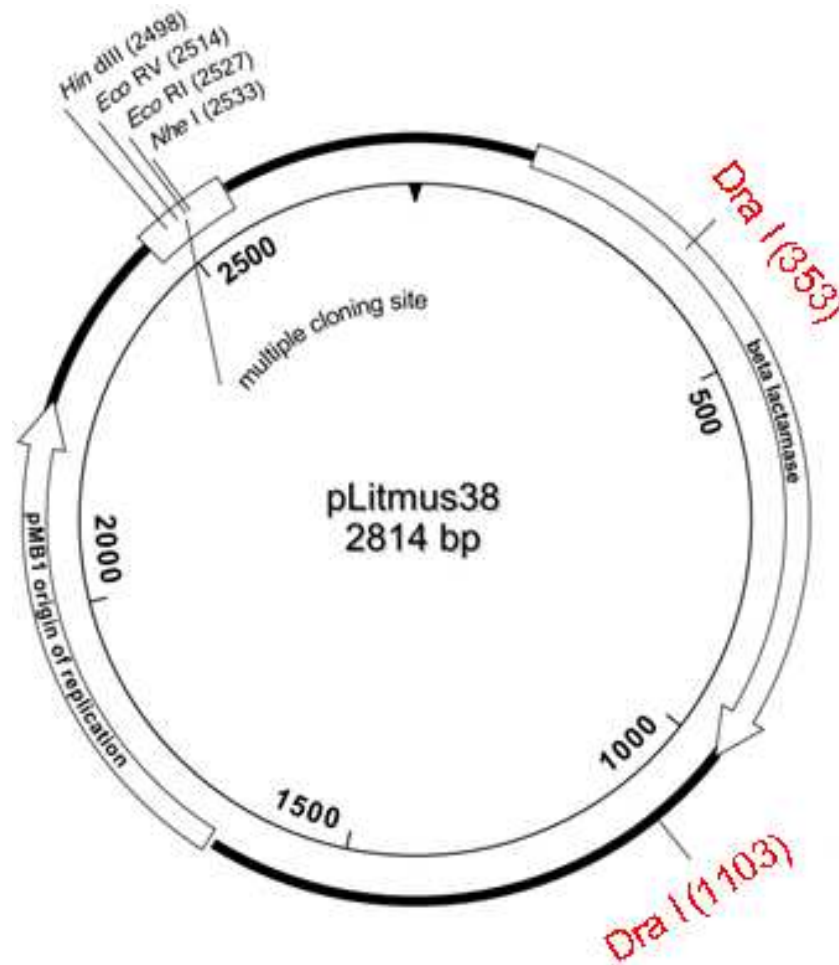
Nukleinsäuren kommen in Form der DNA (Desoxy-Ribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure) vor. Die DNA ist der Träger der Erbinformation, während die verschiedenen RNAs an der Umsetzung der Erbinformation beteiligt sind.

Die DNA besteht aus zwei Polynukleotid-Strängen, die über Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den Basen der gegenüberliegenden Nukleotide ausbilden, zusammengehalten werden. Durch die schraubenförmige Verwindung der beiden Polynukleotid-Stränge entsteht das charakteristische Bild der Doppelhelix.

Eine bestimmte Nukleotidsequenz der DNA, welche für die Aminosäuresequenz eines Proteins codiert, wird als Gen bezeichnet. Ein Gen kann viele tausend Nukleotide lang sein. Das Genom eines Organismus ist somit die Summe der genetischen Information eines Organismus. Man spricht dementsprechend von genomischer DNA. Bakterien besitzen darüber hinaus noch kurze, zirkuläre und sich autonom replizierende DNA-Moleküle, die als Plasmide bezeichnet werden.

In diesem Versuch wird ein kommerzielles Plasmid (pLitmus38[®], Firma: NEB, siehe Abbildung) eingesetzt.

Solche Plasmide besitzen einen Replikationsursprung (origin of replication, Ori), Funktionsgene zur Selektion (z.B. Beta-Lactamase) und können desweiteren singuläre aber auch mehrfache Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen aufweisen. pLitmus38 besitzt eine Größe von 2814 bp und weist singuläre Restriktionsstellen für z.B. HindIII und EcoRV (multiple cloning site, MCS) und zwei Restriktionsstellen für **DraI** auf (siehe folgende Abbildung).

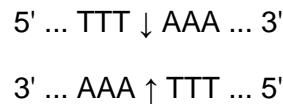


Genkarte des Plasmids pLitmus38® (Quelle: NEB)

In dem durchzuführenden Versuch wird genomische DNA mit Hilfe eines kommerziellen Kits aus Vollblut (v. Schlachthof) isoliert. Dabei werden Zellen unter denaturierenden Bedingungen lysiert und danach die DNA an eine Silikatmatrix gebunden. Zellbestandteile, z.B. Proteine und andere Kontaminationen können durch „Waschen“ mit Puffer einfach entfernt werden. Die so gereinigte DNA wird darauf mit einem Niedrigsalzpuffer eluiert.

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch bestimmt werden. Hierbei wird die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL DNA. Der Quotient von 260/280 gibt die Reinheit der DNA-Präparation an und sollte bei 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination, beispielsweise mit Proteinen, hin.

In dritten Teil dieses Versuches wird sowohl die genomische als auch plasmidäre DNA mit der Restriktionsendonuklease Dral „geschnitten“. Enzyme, die die Phosphodiesterbindung der DNA sequenzspezifisch hydrolytisch spalten und somit die DNA „schneiden“, nennt man Restriktionsendonukleasen. Das Enzym Dral erkennt die folgende spezifische Sequenz



und „schneidet“ den DNA-Doppelstrang ohne überhängende Enden zu generieren („blunt end“).

DNA lässt sich auf Agarose-Gelen elektrophoretisch auftrennen. Bei entsprechendem pH-Wert liegen die Phosphatgruppen der Nukleotide dissoziiert vor (negative Ladung). Dementsprechend wandern die Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird bestimmt durch die elektrische Ladung, die Größe der DNA und deren Interaktion mit dem Agarosegel.

Ziel des Versuches ist, anhand der Restriktionsanalyse und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der DNA zu evaluieren, welche der Proben die genomische und welche die plasmidäre DNA gewesen ist.

Diskutieren Sie bitte Ihre Beobachtung.

6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut (Schweineblut, gerinnungsgehemmt, Schlachthof)

- (1) 200 μ L Vollblut + 25 μ L Protease + 200 μ L B3-Puffer (Achtung: Puffer enthält chaotrope Salze!) 10 sec vortexen
- (2) 15 Minuten bei 70°C inkubieren
- (3) Während der Inkubation 1x kurz vortexen
- (4) Nach der Inkubation werden 210 μ L Ethanol hinzu pipettiert
- (5) Lösung vortexen und auf die Säule pipettieren
- (6) 1 Minute bei 11000 x g zentrifugieren
- (7) Säulendurchfluss verwerfen
- (8) 500 μ L Waschpuffer1 auf die Säule pipettieren
- (9) 1 Minute bei 11000 x g zentrifugieren
- (10) Säulendurchfluss verwerfen
- (11) 600 μ L Waschpuffer2 auf die Säule pipettieren
- (12) 1 Minute bei 11000 x g zentrifugieren
- (13) Säulendurchfluss verwerfen
- (14) Säule 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugieren
- (15) Säule in neues Gefäß stecken
- (16) 50 μ L Elutionspuffer (70°C) auf die Säule pipettieren
- (17) Säule 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- (18) 1 Minute bei 11000 x g zentrifugieren
- (19) Durchfluss (enthält DNA) in neues Eppendorfgefäß pipettieren
- (20) Schritt 16 bis 19 wiederholen, die Eluate im Anschluss zusammen pipettieren und vorsichtig mischen
- (21) Eluat photometrisch messen

6.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit

Mittels Extinktionsmessung der unverdünnten DNA-Lösung (aus 6.1) können bei jeweils 260 bzw. 280 nm die Konzentration und weiterhin die Reinheit bestimmt werden.

Die Proben werden bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Elutionspuffer als Referenzwert photometrisch gemessen (gemessene Extinktion sollte 0,1 bis 1 betragen).

Dieser Wert erfasst die **DNA-Konzentration** in der Lösung (Erklärung s. S. 39).

$$E_{260} \times 50 = \mu\text{g DNA} / \text{mL}$$

Zusätzlich werden die Proben bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch gemessen.

Der Quotient aus 260/280 wird zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Präparation berechnet.

$$\frac{E_{260}}{E_{280}} = Q \left(\begin{array}{l} Q > 1,4 \text{ reine DNA} \\ Q < 1,4 \text{ verunreinigte DNA} \end{array} \right)$$

Diese präparierte DNA kann nun bei -20°C gelagert oder direkt für weitere Analysen verwendet werden.

6.3 Enzymatische Spaltung von DNA

- (1) Zu zwei unbekanntem Proben je 5 μL werden je 10 μL Puffer und je 5 μL DraI (Restriktionsendonuklease) pipettiert.
- (2) Beide Ansätze werden gemischt, kurz zentrifugiert und für 15 min. bei 37°C inkubiert.
- (3) Danach wird zu beiden Ansätzen je 5 μL Stopp-Mix pipettiert und die Proben mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

6.4 Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA

Je 20 μL der vorbereiteten Proben (siehe oben) werden durch Unterschichten vorsichtig in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert.

Von der Assistentin/dem Assistenten wird ein Marker als Größenstandard und ein ungeschnittenes Plasmid mit aufgetragen.

Es wird eine Spannung von 90 V für 45 Minuten angelegt.

Das Ergebnis wird unter UV-Licht ausgewertet: Ethidiumbromid, das dem Gel zugesetzt wurde, interkaliert mit dem DNA-Doppelstrang und fluoresziert im UV-Licht, wodurch die Nucleinsäuren im Gel sichtbar werden.

ACHTUNG! Die Augen sind unbedingt mit einem speziellen Schirm vor der UV-Strahlung zu schützen! Ethidiumbromid steht unter dem Verdacht karzinogen zu sein!

Die Größe der Banden kann über den Marker (Größenstandard) abgeschätzt werden.

Diskutieren Sie nun das Laufverhalten Ihrer Proben auf dem Agarosegel. Welche der Proben ist die plasmidäre und welche die genomische DNA und warum?

Beschreiben Sie weitere Beobachtungen.

7 HORMONE / VITAMINE

Das Peptidhormon Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet und bei hohen Blutglukosespiegeln ausgeschüttet. Über den Blutkreislauf gelangt es ans Zielgewebe (Leber, Muskulatur, Fett) und erhöht die Glucoseaufnahme in Muskel- und Fettzellen indem es den Einbau von GLUT4 Transportern in die Zellmembran stimuliert.

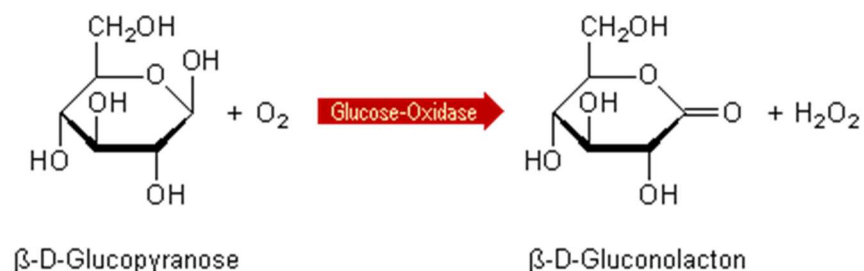
Durch eine insulininduzierte Enzymaktivierung werden darüber hinaus viele andere Stoffwechselprozesse beschleunigt: Glykolyse, Glykogensynthese, Lipidsynthese und Pentosephosphatweg. Dagegen werden Glykogenolyse, Glukoneogenese und Lipolyse durch Insulin gehemmt.

7.1 Nachweis der Insulinwirkung im Blut

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut ist für diabetische Menschen und Tiere lebensnotwendig. Die Glukosemessung erfolgt in Kapillarblut mittels eines Glucometers aus den Fingerkuppen (Menschen) und wahlweise an Pfoten- oder Ohrkapillaren (Hund und Katze). Abhängig von der gemessenen Glukosekonzentration wird die Menge an zu verabreichendem Insulin berechnet.

Versuchsprinzip:

Das aufgetropfte Blut wird über eine Kapillare im Teststreifen in eine Reaktionskammer angesogen. Diese enthält das Enzym Glucoseoxidase. Die Glucoseoxidase katalysiert unter Anwesenheit von Luftsauerstoff die Oxidation von Glukose ($C_6H_{12}O_6$) in Gluconolacton ($C_6H_{10}O_6$), wobei der freiwerdende Wasserstoff mit dem Luftsauerstoff zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagiert.



Bei Einführen des Teststreifens in das Glucometer wird die Reaktionskammer über integrierte Elektroden mit einer Spannungsquelle verbunden und dadurch das entstandene Wasserstoffperoxid elektrolytisch oxidiert.

Die dabei freiwerdenden Elektronen werden auf die Kathode übertragen und der Stromfluss wird amperimetrisch gemessen. Das chemische Signal wird somit in ein elektrisches Signal umgewandelt und der Messwert rechnerisch interpretiert. Die Höhe des Messwertes ist somit proportional zur Glukosekonzentration.

Versuchsdurchführung:

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration wird zunächst mit einer Lanzette bei einem **freiwilligen, nüchternen** Probanden eine Fingerkuppe angestochen und ein Tropfen Blut mit dem entsprechenden Testplättchen aufgefangen. Das Messergebnis wird abgelesen und festgehalten.

Anschließend nimmt der Proband Nahrung zu sich und die Messung wird nach dem oben beschriebenen Versuchsprinzip nach ca. 1 - 2 Stunden wiederholt.

Messwert 1:

Messwert 2:

In welchem Verhältnis hat sich die gemessene Glukosekonzentration verändert?

7.2 Insulinnachweis mit Dot Blot

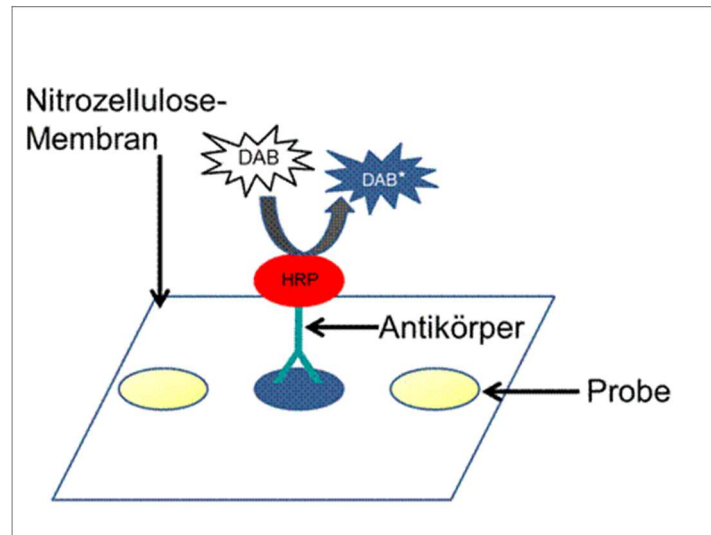
Versuchsprinzip:

Der Dot Blot ist eine einfache Methode, um Proteine in einer Probe nachzuweisen. Im Unterschied zum Western Blot werden die Proteine vor dem Nachweis nicht mittels Elektrophorese getrennt.

Um das kleine Peptid Insulin nachweisen zu können, muss es mit größeren Proteinen vernetzt werden (BSA in der Verdünnungs-Lösung).

Die Probe wird dann direkt auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen (Dot = Punkt) und das gesuchte Protein mittels eines Antikörpers detektiert. An den Antikörper ist ein Enzym gebunden (HRP, Horse Radish Peroxidase, Meerrettichperoxidase), welches den Farbstoff Diaminobenzidin (DAB) zu einem unlöslichen, blau-grauen Präzipitat umsetzt (DAB*).

Der Dot Blot kann als semi-quantitative Nachweismethode genutzt werden.



Fragestellung: In unserem Versuch soll in einer Probe die unbekannte Konzentration des Insulins durch Vergleich mit der Standard-Reihe abgeschätzt werden.

Versuchsdurchführung:

Während des gesamten Versuches sind Handschuhe zu tragen!

1. Herstellung einer Insulin-Standard-Reihe und der Kontrolle

Aus einer Insulin-Stammlösung (1 mg/mL) werden in einer Verdünnungsreihe mit einer BSA-haltigen Lösung (0,1 % bovines Serumalbumin in H₂O) 3 Standard-Lösungen hergestellt und auf Eis gestellt.

Verdünnungsreihe

Es werden 3 Plastiktubes (1,5 mL) beschriftet und nach folgendem Schema befüllt:

	Standard 1 0,1 mg/mL	Standard 2 0,02 mg/mL	Standard 3 0,004 mg/mL
Verdünnung (1 : ?)	1 :	1 :	1 :
	Stammlösung (1 mg/mL)	Standard 1 (0,1 mg/mL)	Standard 2 (0,02 mg/mL)
	µL	µL	µL
BSA-Lösung	µL	µL	µL
Endvolumen	100 µL	100 µL	100 µL

2. Zugabe von Glutardialdehyd

Die Standard-Lösungen, die Probe und die BSA-Lösung (_____ -Kontrolle) werden mit 50%iger Glutardialdehydlösung verdünnt.

In der Endverdünnung soll das Glutardialdehyd in einer Konzentration von 4% vorliegen und das Endvolumen soll 25 μL betragen.

Es werden 5 Plastiktubes (1,5 mL) beschriftet und nach folgendem Schema befüllt:

Pro Tube:

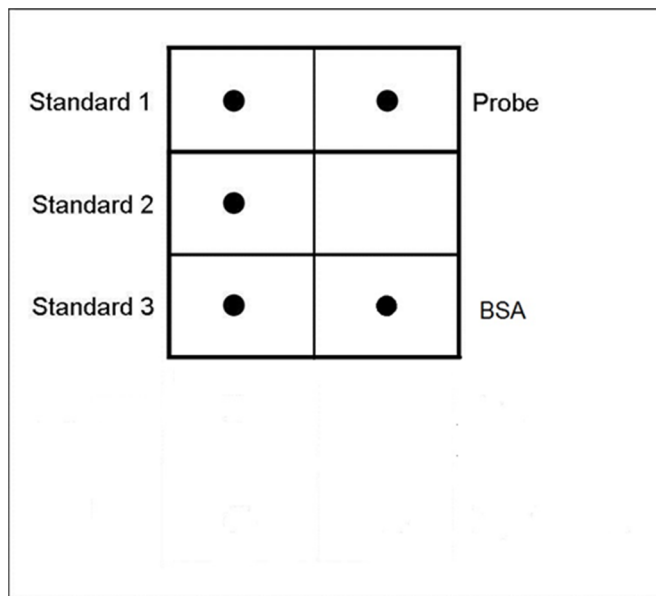
je Standard (3x), Probe (1x), BSA-Kontrolle (1x): _____ μL

Glutardialdehyd (50%): _____ μL

Die Standard-Lösungen, die Probe und die BSA-Lösung werden mit Glutardialdehyd inkubiert (15 Minuten bei 37°C). Hierbei fungiert Glutardialdehyd als Cross-linker zwischen Insulin und BSA, wodurch eine stabile Vernetzung der Moleküle ermöglicht wird.

3. Auftropfen der Proben, Standards und Kontrolle

Es wird jeweils 1 μL von den Standard-Lösungen, der Probe und dem BSA auf die Membran aufgetragen.



Anschließend lässt man die Membran trocknen.

4. Blockierung der Membran

Die Membran wird mit ca. 5 mL Blockierlösung (5% BSA in Puffer) gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Erklären Sie warum!

5. Antikörper

Aus einer Stammlösung des anti-Insulin Antikörpers (Maus anti-Schwein-Insulin, IgG-Fraktion, monoklonal, HRP konjugiert) wurden 3 mL Gebrauchslösung durch Verdünnung (1:150000) mit 0,1% BSA in Puffer hergestellt und bereitgestellt und von der/dem Assistentin/en ausgegeben.

Die Blockierlösung wird vorsichtig abgegossen und die Membran mit der Antikörper-Gebrauchslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

6. Waschen

Die Membran wird 3x5 Minuten mit ca. 4 mL Wasch-Puffer gespült.

7. Detektion

Die Membranen werden kurz mit der bereitgestellten DAB-Lösung inkubiert. Bei Sichtbarwerden des blau-grauen Präzipitates wird die Färbung gestoppt und die DAB-Lösung in die dafür vorgesehenen Abfallflaschen gegossen (**Achtung: DAB ist ein Giftstoff! Bitte nicht in den Ausguss entsorgen!**) und die Membran mit H₂O kurz gewaschen. Anschließend lässt man die Membran trocknen.

8. Auswertung:

Die Konzentration des Insulins kann mittels Farbvergleich mit den Standards abgeschätzt werden.

Geschätzte Konzentration: _____

7.3 Charakterisierung und Trennung von Vitaminen

Vitamine sind organische Verbindungen, die für lebenswichtige Funktionen (nicht Energiegewinnung!) essentiell sind, vom Organismus aber zum größten Teil nicht selbst synthetisiert werden können. Sie müssen deshalb mit der Nahrung zugeführt werden. Einige Vitamine können auch als Vorstufen (Provitamine) aufgenommen werden, die der Körper dann in die biologisch aktive Form umwandelt.

Vitamine werden in zwei Klassen eingeteilt:

- wasserlösliche Vitamine (z.B. Vitamin B₂ = Riboflavin, Vitamin C)
- fettlösliche Vitamine: A, D, E, K (EDeKA)

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein Zuckerderivat, welches von den meisten Spezies selbst gebildet werden kann. Eine Aufnahme aus der Nahrung ist abgesehen vom Menschen (Tagesbedarf 200-300mg), insbesondere beim Meerschweinchen (Tagesbedarf 10-15mg) sowie bei Primaten (>1g) notwendig. Vitamin C ist ein wichtiges Antioxidans. Darüber hinaus ist es beteiligt an:

- Hydroxylierung von
 - Prolin (Kollagenbiosynthese)
 - Steroiden
 - Dopamin (zu Noradrenalin)
 - Tryptophan (zu 5-Hydroxytryptophan)
- Umbaus der Aminosäure Tryptophan zu Serotonin
- Bildung von Gallensäuren
- Abbau cyclischer Aminosäuren
- Carnithinbiosynthese

Aufgabenstellung:

Es sollen verschiedene Nahrungsquellen auf ihren Vitamin C-Gehalt untersucht werden: Apfel, Petersilie, rote Paprika und herkömmliche Vitamin C Tropfen für Meerschweinchen (Vitakraft).

Aus den oben genannten Nahrungsquellen werden Proben entnommen und mit zwei verschiedenen Verfahren der Vitamin C-Gehalt ermittelt.

Erstellen Sie ein Kurzprotokoll für die Extraktion des Vitamin C aus den verschiedenen Proben.

Versuchsdurchführung:

A. Schnellnachweis: Quantofix®-Teststäbchen Ascorbinsäure (M&N) zum Vitamin C-Nachweis

Die Extrakte der entsprechenden Proben werden nacheinander auf die Teststäbchen getropft. Anschließend erfolgt der Abgleich mit der angegebenen Farbskala.

B. Tillmans-Reagenz

In einem Erlenmeyerkolben wird 1 mL des zu untersuchenden Extraktes, bzw. Standards (1 mg/mL) vorgelegt. Dazu werden 9 mL Wasser pipettiert. Es wird bis zum Farbumschlag mit DCPIP titriert. Der Versuch ist **zweimal** durchzuführen. Aus den ermittelten Verbrauchsmengen an DCPIP wird der Mittelwert gebildet und anschließend die Konzentration von Vitamin C errechnet.

Messwert Standard (1 mg/mL) in mL:

Messwert 1 in mL:

Messwert 2 in mL:

Mittelwert in mL:

Vitamin C-Gehalt: Ascorbinsäure (mg) = $\frac{\text{verbrauchte mL}}{\text{verbrauchte mL Ascorbinsäure-Standard}} \cdot$

*Verbrauchte mL = Mittelwert des verbrauchten DCPIP Volumens pro Nahrungsquelle/Probe
 Verbrauchte mL Ascorbinsäure-Standard = Mittelwert des verbrauchten DCPIP Volumens bei der Titration des Standards

C. Berechnung der benötigten Tagesmenge des jeweiligen Futtermittels:

	Ergebnis in mg		Literaturwerte	Benötigte Tagesmenge (in g)
	Teststäbchen	Tillmanns Reagenz		
Apfel				
Paprika, rot				
Petersilie				
Vitamin C Tropfen				

Welche Angaben zur Vitamin C Konzentration der untersuchten Nahrungsmittel finden sich in der Literatur?

Diskutieren Sie ob die unterstützende Gabe von Vitamintropfen beim Meerschweinchen sinnvoll ist.