

Biochemisches

Praktikum 1

ENZYMKINETIK

Praktischer Teil

Sicherheitshinweise Enzymkinetik



Sicherheitshinweise und Entsorgungsrichtlinien:

Alkohol Dehydrogenase, ADH:

- Na-Pyrophosphat (Bestandteil des ADH-Puffers) ist reizend, Hautkontakt vermeiden, Schutzkleidung (Handschuhe, Schutzbrille) tragen; bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser waschen;
- Semicarbazid (Bestandteil des ADH-Puffers) ist giftig, steht im Verdacht mutagen und kanzerogen zu sein; Hautkontakt vermeiden, Schutzkleidung (Handschuhe, Schutzbrille) tragen; bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser waschen;
- **Reaktionsansätze mit ADH-Puffer tagsüber in einem Becherglas sammeln, am Ende des Tages im flüssigen Sondermüll (wässrige Gefahrstoffe) entsorgen.**
- Ethanol und Propanol sind leicht entflammbar, kein offenes Feuer
- Propanol ist giftig, Hautkontakt vermeiden, Schutzkleidung (Handschuhe, Schutzbrille) tragen; bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser waschen;
- Fomepizol ist äußerst giftig, Hautkontakt vermeiden, Schutzkleidung (Handschuhe, Schutzbrille) tragen; bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser waschen; **Abfall im flüssigen Sondermüll (wässrige Gefahrstoffe) entsorgen.**

Alkalische Phosphatase, AP:

- Imidazol (Bestandteil des AP-Puffers) ist ein Gefahrstoff, Hautkontakt vermeiden, Schutzkleidung (Handschuhe, Schutzbrille) tragen; bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser waschen;
- Borsäure (Bestandteil des AP-Puffers) ist ein Gefahrstoff, Hautkontakt vermeiden, Schutzkleidung (Handschuhe, Schutzbrille) tragen; bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser waschen;
- p-Nitro-Phenylphosphat (Substrat der AP) ist Augen und Haut reizend; Schutzkleidung (Handschuhe, Schutzbrille) tragen; bei Haut- oder Augenkontakt sofort mit viel Wasser waschen;
- **Reaktionsansätze mit AP-Puffer oder p-Nitro-Phenylphosphat tagsüber in einem Becherglas sammeln, am Ende des Tages im flüssigen Sondermüll (wässrige Gefahrstoffe) entsorgen.**

Arbeitshinweise Enzymkinetik

Arbeitshinweise allgemein:

Achtung: Die Pipettiergenauigkeit ist besonders beim Pipettieren der AP-Lösung sehr wichtig (schon 1 µl Pipettierfehler bewirken **20 %** mehr oder weniger Enzym!!)

Für AP 10 µl Pipette mit weißen Spitzen verwenden;

Spitze **NICHT** tief in die Lösung eintauchen, sondern nur auf die Flüssigkeitsoberfläche aufsetzen bzw. wenige Millimeter tief eintauchen; Hochziehen der Flüssigkeit beobachten; keine zusätzliche Flüssigkeit über die Außenseite der Spitze verschleppen;

Beim Hochziehen der Lösung den Druckknopf nicht schnell loslassen, sondern langsam hochführen - besonders wichtig beim Pipettieren mit der 1000 µl Pipette, da sonst die Flüssigkeit "hoch schlägt" und in den Pipettenschaft gelangt ⇒ keine Pipettiergenauigkeit und Verschmutzung/Beschädigung der Pipette!

- während der Arbeit Handschuhe und Schutzbrille tragen
- Entsorgungsvorschriften beachten
- für jeden Pipettierschritt frische Spitze verwenden

Arbeitshinweise ADH Versuche:

- ADH-Puffer nicht auf Eis oder im Kühlschrank lagern (fällt aus)
- NAD-Lösung kühlen (Eis oder 4 °C Kühlschrank)
- Glutathion kühlen (Eis oder 4 °C Kühlschrank)
- ADH-Lösung wird täglich frisch angesetzt, kühlen, (Eis oder 4 °C Kühlschrank)
- Ethanol und 1-Propanol nicht kühlen

Arbeitshinweise AP Versuche:

- AP-Verdünnung wird täglich frisch angesetzt, auf Eis lagern
- p-Nitrophenylphosphat auf Eis bzw. auf 4 °C (Kühlschrank) lagern
- Puffer-AP nicht kühlen

Arbeitshinweise Enzymkinetik

Ein kurzer Hinweis zu den Pipetten im Praktikum:

Das genaue Pipettieren ist ein Zusammenspiel vieler Komponenten - die Pipette selbst, die (richtig) aufgesetzte Kunststoff-Spitze, die Eigenschaften der zu pipettierenden Lösung (Oberflächenspannung + Viskosität) und *die Erfahrung der pipettierenden Person*. Selbstverständlich bemühen wir uns, Ihnen gut funktionierende Pipetten zur Verfügung zu stellen. Dazu werden die Pipetten mitunter zur Wartung durch eine Spezialfirma gebracht (Kosten ca. 40 € pro Pipette). Diese versieht die Pipette dann mit einem Aufkleber und einem Datum, wann die nächste Wartung empfohlen wird.

Dieses Datum ist aber *kein „Ablaufdatum“!* Nur bei kommerziellem Einsatz (GMP/GLP Richtlinien) spielt es eine Rolle; dort dient es vor allen dazu, eine regelmäßige Prüfung der Pipetten zu *dokumentieren*. Tatsächlich repariert oder neu geeicht werden müssen die Pipetten meist viel seltener. Anders ausgedrückt: auch wenn das Datum Ihrer Pipette weit in der Vergangenheit liegt, ist das alleine kein Grund, dem Gerät zu misstrauen.

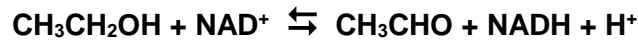
Natürlich ist es immer möglich, dass technische Probleme bei einer Pipette auftreten. Bitte unterstützen Sie uns bei der Fehlersuche, wenn Sie einen Defekt vermuten:

1. Nehmen Sie Ihre Pipette mit zur Feinwaage und versuchen Sie, drei unterschiedliche Volumina jeweils 5-mal zu pipettieren (ddH₂O, 1 µl = 1 mg). Stimmt das Volumen oder gibt es systematische Abweichungen? Gibt es eine große Fehlerstreuung?
2. Nehmen Sie nun die entsprechende Pipette einer *anderen* Gruppe und wiederholen Sie das gleiche Schema. Geht die systematische Abweichung verloren (bzw. ändert sie sich)? Ist die Fehlerstreuung kleiner geworden?
3. Falls ja: Machen Sie noch einmal die Gegenprobe mit Ihrer eigenen Pipette und zeigen Sie dann alle Werte dem/der Assistenten/in. Vielen Dank für Ihre Unterstützung!

Alkohol Dehydrogenase, ADH

Alkohol-Dehydrogenase - ADH:

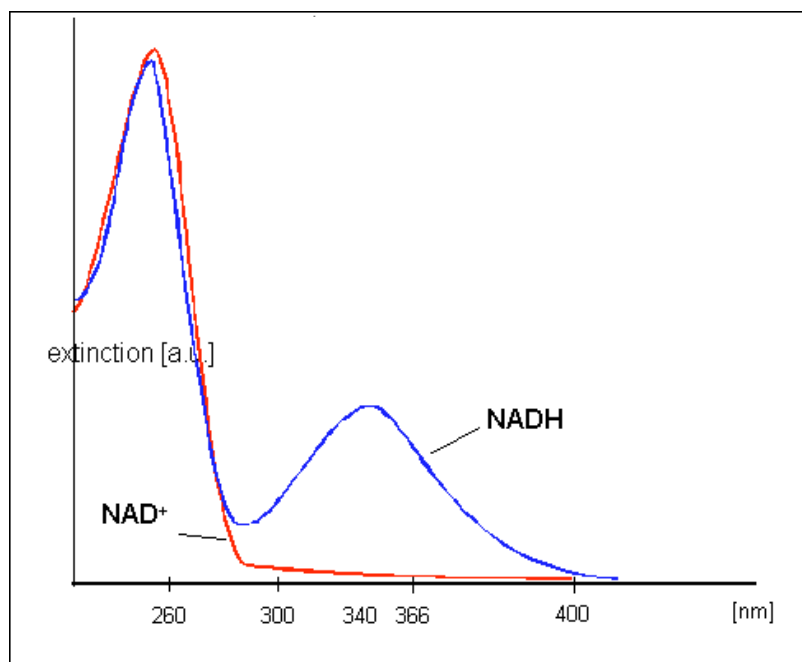
Das Enzym Alkohol-Dehydrogenase katalysiert die reversible Oxidation von Alkohol zu Acetaldehyd.



Das Hefeenzym, das im Praktikum verwendet wird, ist 150 kDa groß, hat vier aktive Zentren und überträgt bei der alkoholischen Gärung Wasserstoff auf Acetaldehyd. Das Produkt ist Ethanol, der aus der Zelle entfernt wird.

Für den Nachweis der ADH-Reaktion wird ein optischer Test verwendet. Bei der Oxidation von Alkohol zum Aldehyd wird jeweils auch ein NAD^+ als Elektronenakzeptor reduziert und in NADH überführt. Für jedes Molekül Aldehyd, das aus einem Molekül Alkohol entsteht, wird also auch ein Molekül NAD^+ in NADH umgewandelt. Während die Umsetzung von Alkohol in Aldehyd nicht direkt nachweisbar ist, kann die Bildung von NADH optisch am Photometer verfolgt werden. NAD^+ und NADH haben ein Absorptionsmaximum bei 255 nm. NADH hat aber noch ein zusätzliches Maximum bei 345 nm. Die Zunahme der Absorption bei 345 nm ist ein direktes Maß für die Umwandlung des Alkohols.

Absorptiospektrum NAD / NADH



Um eine kontinuierliche Umsetzung des Alkohols zu gewährleisten, muss der gebildete Aldehyd aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden. Dies wird durch die Zugabe von Semicarbazid zum Reaktionspuffer erreicht. Semicarbazid reagiert mit dem Aldehyd zu einem Semicarbazon, das schwer löslich ist.

ADH aus Hefe zeigt eine deutliche Substratspezifität. Verschiedene Alkohole werden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt. Dies wird im 1. Praktikumsversuch durch Messung der Enzymkinetik mit Ethanol und 1-Propanol untersucht. Die Umsetzungsgeschwindigkeit der beiden Alkohole wird in Abhängigkeit von ihrer Konzentration gemessen, aus den Messergebnissen je ein Lineweaver-Burk-Diagramm erstellt und V_{\max} und K_M bestimmt.

ADH – Substratspezifität, Tag 1

Substratspezifität der ADH

Bestimmung von v_{\max} und K_M für Ethanol und 1-Propanol, Berechnung der Wechselzahl

Materialien

-	0,3 M Ethanol p.A.;	(MW: 46,07 g mol ⁻¹ ; D: 0,79 g cm ⁻³)	25	ml
-	0,6 M 1-Propanol p.A.;	(MW: 60,1 g mol ⁻¹ ; D: 0,8 g cm ⁻³)	20	ml
-	30 mM NAD, gelöst in 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0	(MW: 663,4 g mol ⁻¹)	6	ml
-	Puffer ADH		50	ml
-	ADH, 1 : (xxxx) verdünnt in 0,1 % BSA (w/v)		2	ml
-	0,25 M Glutathion pH 9,0	(MW: 307,3 g mol ⁻¹)	6	ml
-	Küvetten			
-	Photometer			
-	Pipetten			
-	Spitzen (weiß, gelb, blau)			
-	Eppendorfgefäße 1,5 ml			

Versuchsdurchführung:

- ◆ Alle Reaktionskomponenten (siehe Tabelle nächste Seite) mit Ausnahme der ADH in einem 1,5 ml Eppi zusammen pipettieren;
- ◆ Reaktionsansätze auf Raumtemperatur kommen lassen
- ◆ vor Beginn der Messung alle Ansätze in beschriftete Küvetten überführen
- ◆ Messung im Photometer bei 366 nm
- ◆ Ansatz 1: Küvette in Photometer, Referenz drücken \Rightarrow Photometer „genullt“
- ◆ ADH in Küvette geben
- ◆ schnell mischen (Parafilmstück auf Küvette, drehen, leicht schütteln), gleichzeitig Stoppuhr starten
- ◆ in Photometer stellen und nach 60 sec. Extinktion ablesen
Die Photometer messen linear in einem Bereich von 0,1 bis ca. 0,8.
Daher:
- ◆ **falls $\Delta\epsilon$ kleiner 0,1 ist, wird weiter gemessen, bis $\Delta\epsilon$ mindestens gleich 0,1**
- ◆ **dann werden Zeit und Extinktion aufschreiben**
- ◆ **NICHT alle Proben länger messen! Nur Proben, deren Absorption nach 1 min kleiner 0,1 sind!**
- ◆ Ansatz 2: Küvette in Photometer, Referenz drücken...
- ◆ ADH in Küvette geben
- ◆ schnell mischen...
- ◆ Ansatz 3:...
- ◆ ...

ADH – Substratspezifität, Tag 1

Substratspezifität ADH: Ethanol – Pipettierschema und Messwerttabelle:

Messpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
µl Ethanol, 0,3 Mol/L	20	30	45	60	75	90	120	150	180	240	300	400
µl H ₂ O	560	550	535	520	505	490	460	430	400	340	280	180
µl Puffer ADH	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290
µl Glutathion 0,25 M	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
µl NAD 0,03 Mol/L	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
µl ADH	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
µl Gesamtvolumen	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Messwerte Ethanol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extinktion												
Zeit in min												
Δε/min												

ADH – Substratspezifität, Tag 1

Substratspezifität ADH: 1-Propanol – Pipettierschema und Messwerttabelle:

Messpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
µl Propanol 0,6 Mol/L	20	30	45	60	75	90	120	150	180	240	300	400
µl H ₂ O	560	550	535	520	505	490	460	430	400	340	280	180
µl Puffer ADH	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290
µl Glutathion 0,25 M	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
µl NAD 0,03 Mol/L	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
µl ADH	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
µl Gesamtvolumen	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Messwerte Reihe A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Extinktion												
Zeit in min												
$\Delta\varepsilon/\text{min}$												

ADH – Hemmung, Tag 2

Hemmung der ADH, Bestimmung der Inhibitorkonstante für Fomepizol

Fomepizol ist ein Inhibitor der ADH. Durch Messung der Enzymkinetik bei verschiedenen Konzentrationen des Hemmstoffes kann festgestellt werden, nach welchem Hemmmechanismus der Inhibitor das Enzym beeinflusst. Zusätzlich können Aussagen über die Affinität von Enzym und Inhibitor durch Berechnung der Inhibitorkonstante K_i gemacht werden.

Materialien

-	0,3 M Ethanol p.A.; (aus Versuch 1 ADH)	(MW: 46,07 g mol ⁻¹ ; D: 0,79 g cm ⁻³)	25	ml
-	30 mM NAD, gelöst in 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0	(MW: 663,4 g mol ⁻¹)	6	ml
-	15 mM Fomepizol,	(MW: 82,1 g mol ⁻¹ ; D: 0,99 g cm ⁻³)	3	ml
-	Puffer ADH		50	ml
-	ADH, 1:(xxxx) verdünnt in 0,1 % BSA (w/v)		2	ml
-	0,25 M Glutathion pH 9,0	(MW: 307,3 g mol ⁻¹)	6	ml
-	Küvetten			
-	Photometer			
-	Pipetten			
-	Spitzen (weiß, gelb, blau)			
-	Eppendorfgefäße 1,5 ml			

Versuchsdurchführung:

- ◆ Versuchsdurchführung analog dem Versuch „Substratspezifität der ADH“ Seite 4.

ADH – Hemmung, Tag 2

Inhibitorkonstante der ADH – Pipettierschemas und Messwerttabellen:

Messpunkte Reihe 1	1	2	3	4	5	6	7	Messpunkte Reihe 2	1	2	3	4	5	6	7
µl Fomepizol 0,015 Mol/L	0	0	0	0	0	0	0	µl Fomepizol 0,015 Mol/L	20	20	20	20	20	20	20
µl Ethanol, 0,3 Mol/L	20	40	60	90	150	220	300	µl Ethanol, 0,3 Mol/L	20	40	60	90	150	220	300
µl H ₂ O	560	540	520	490	430	360	280	µl H ₂ O	540	520	500	470	410	340	260
µl Puffer ADH	290	290	290	290	290	290	290	µl Puffer ADH	290	290	290	290	290	290	290
µl NAD 0,03 Mol/L	60	60	60	60	60	60	60	µl NAD 0,03 Mol/L	60	60	60	60	60	60	60
Glutathion 0,25 M	40	40	40	40	40	40	40	Glutathion 0,25 M	40	40	40	40	40	40	40
µl ADH	30	30	30	30	30	30	30	µl ADH	30	30	30	30	30	30	30
µl Gesamtvolumen	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	µl Gesamtvolumen	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Messwerte Reihe 1	1	2	3	4	5	6	7	Messwerte Reihe 2	1	2	3	4	5	6	7
Extinktion								Extinktion							
Zeit in min								Zeit in min							
Δε/min								Δε/min							

ADH – Hemmung, Tag 2

Messpunkte Reihe 3	1	2	3	4	5	6	7	Messpunkte Reihe 4	1	2	3	4	5	6	7
µl Fomepizol 0,015 Mol/L	40	40	40	40	40	40	40	µl Fomepizol 0,015 Mol/L	80	80	80	80	80	80	80
µl Ethanol, 0,3 Mol/L	20	40	60	90	150	220	300	µl Ethanol, 0,3 Mol/L	20	40	60	90	150	220	300
µl H ₂ O	520	500	480	450	390	320	240	µl H ₂ O	480	460	440	410	350	280	200
µl Puffer ADH	290	290	290	290	290	290	290	µl Puffer ADH	290	290	290	290	290	290	290
µl NAD 0,03 Mol/L	60	60	60	60	60	60	60	µl NAD 0,03 Mol/L	60	60	60	60	60	60	60
Glutathion 0,25 M	40	40	40	40	40	40	40	Glutathion 0,25 M	40	40	40	40	40	40	40
µl ADH	30	30	30	30	30	30	30	µl ADH	30	30	30	30	30	30	30
µl Gesamtvolumen	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	µl Gesamtvolumen	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Messwerte Reihe 3	1	2	3	4	5	6	7	Messwerte Reihe 4	1	2	3	4	5	6	7
Extinktion								Extinktion							
Zeit in min								Zeit in min							
Δε/min								Δε/min							

ADH – Hemmung, Tag 2

Messpunkte Reihe 5	1	2	3	4	5	6	7
µl Fomepizol 0,015 Mol/L	160	160	160	160	160	160	160
µl Ethanol, 0,3 Mol/L	20	40	60	90	150	220	300
µl H ₂ O	400	380	360	330	270	200	120
µl Puffer ADH	290	290	290	290	290	290	290
µl NAD 0,03 Mol/L	60	60	60	60	60	60	60
Glutathion 0,25 M	40	40	40	40	40	40	40
µl ADH	30	30	30	30	30	30	30
µl Gesamtvolumen	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Messwerte Reihe 1	1	2	3	4	5	6	7
Extinktion							
Zeit in min							
Δε/min							

ADH Alkoholbestimmung, Tag 2

ADH – Bestimmung des Alkoholgehalts einer Likör-Kirsch-Praline oder eines stark alkoholischen Getränks

Die enzymatische Reaktion der ADH kann zur Bestimmung des Alkoholgehaltes einer Lösung verwendet werden. Dazu werden keine Kinetiken gemessen, sondern Reaktionsendpunkte. D.h. es wird bestimmt, wie viel NADH beim Umsatz einer bestimmten Menge Ethanol gebildet wird. Aus diesen Messungen lässt sich eine Eichgerade erstellen, aus der der Alkoholgehalt einer unbekannt Probe bestimmt werden kann.

Materialien

- Ethanollösung 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,75%, 1%
(Prozentangaben v/v = Volumen Prozent!)
- Alkoholprobe
- 30 mM NAD, (MW: 663,4 g mol⁻¹)
gelöst in 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0
- Puffer ADH
- ADH, 1:(xxxx) verdünnt in 0,1 % BSA (w/v)
- 0,25 M Glutathion pH 9,0 (MW: 307,3 g mol⁻¹)
- Küvetten
- Photometer
- Pipetten
- Spitzen (weiß, gelb, blau)
- Eppendorfgefäße 1,5 ml

Versuchsdurchführung:

- ◆ Ansatz 1:
 - 290 µl ADH Puffer
 - 60 µl NAD, 30 mM
 - 40 µl Glutathion 0,25 M
 - 10 µl Ethanol 0,1 %
 - 570 µl H₂O
 - 30 µl ADH
- ◆ Ansatz 2 – 7 analog ansetzen mit 10 µl Ethanol 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,75%, 1%
- ◆ Ansatz 8 und 9:
Likör aus Kirschpraline verdünnen 1 : 20 bzw. Alkoholprobe verdünnen nach Ansage
Reaktionen analog Ansatz 1 ansetzen mit je 5 µl verdünntem Likör aus Kirschpraline
- ◆ Ansatz 10 und 11: analog Ansatz 8, mit je 10 µl verdünnten Likör aus Kirschpraline bzw.
verdünnter Alkoholprobe
- ◆ **Referenz: analog Ansatz 1 ohne Ethanol! (10 µl H₂O extra zugeben)**
- ◆ alle Reaktionsansätze mit Ausnahme der ADH in einem 1,5 ml Eppi zusammen pipettieren
und mischen;
- ◆ Reaktionsansätze auf Raumtemperatur kommen lassen
- ◆ alle Ansätze in beschriftete Küvetten überführen
- ◆ 30 µl ADH in Referenzküvette geben und mischen
- ◆ Ansätze 1 – 11 im Abstand von 30 sec - 1 min starten durch Zugabe von 30 µl ADH und
sofortigem Mischen
- ◆ Ansätze 30 min inkubieren; **Referenzküvette einsetzen und Photometer nullen**; dann im
Abstand von 30 sec - 1 min Reaktionsansätze messen im Photometer bei 366 nm
- ◆ Werte notieren

ADH Alkoholbestimmung, Tag 2

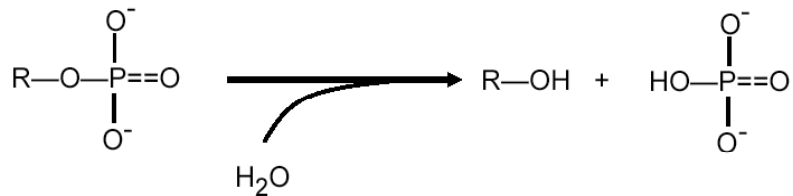
Ansatz	Ethanol %	Messwert
1	0,1	
2	0,2	
3	0,3	
4	0,4	
5	0,5	
6	0,75	
7	1,0	
8	?	
9	?	
10	?	
11	?	

Achtung: Sie messen hier nicht die Reaktionsgeschwindigkeit der ADH, sondern den Gesamtumsatz des zugegebenen Alkohols! Der Reaktionsansatz wird **MIT** ADH 30 min inkubiert, um den vollständigen Umsatz von Alkohol in Aldehyd abzuwarten. Da die ADH eine gewisse Eigenaktivität aufweist, wird das Photometer gegen die **Referenz** genullt, die **ebenfalls ADH**, aber **keinen Ethanol** enthält!

Alkalische Phosphatase, AP

Alkalische Phosphatase – AP

Phosphatasen sind Enzyme, die Monophosphorsäureester hydrolysieren. Ihre Substrate sind Alkohole, Zucker, Phenole oder Nukleosidmonophosphate. Auch das Phosphat am 5'-Ende eines DNA-Stranges oder phosphorylierte Aminosäuren in Proteinen werden hydrolysiert.



Je nach Enzym zeigen Phosphatasen eine pH-Wert abhängige Aktivität. Es gibt saure Phosphatasen, die bei niedrigen pH-Werten maximale Reaktionsgeschwindigkeit zeigen und alkalische Phosphatasen, die im basischen Milieu optimal arbeiten.

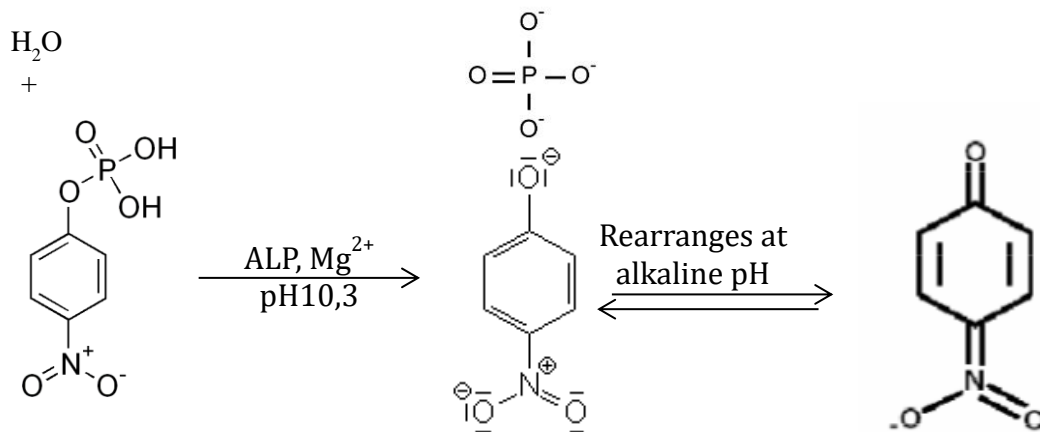
Die alkalische Phosphatase des Menschen kommt hauptsächlich in Osteoblasten im Knochenmark vor und ist wichtig für die Knochenneubildung. Das Enzym wird in der Medizin diagnostisch als Marker für Knochen- und Lebererkrankungen und als Tumormarker bei Osteosarkomen verwendet.

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase Aktivität erfolgt über die Spaltung von p-Nitrophenylphosphat.

P-Nitrophenyl-Phosphat
(farblos)

Nitrophenolat Anion
(gelb)

Nitrophenon
(gelb)



Die Bildung des gelben Nitrophenolats kann direkt durch Messung der Absorption bei 405 nm verfolgt werden.

An Hand dieser Reaktion soll der Einfluss äußerer Faktoren wie z.B. des pH-Werts, der Temperatur oder der Salzkonzentration auf die Enzym-Aktivität der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) untersucht werden.

AP – Abhängigkeit vom pH-Wert, Tag 3

Alkalische Phosphatase – Abhängigkeit der Enzymaktivität (V_{max}) vom pH-Wert

Materialien

- 10 mM p-Nitrophenylphosphat
- AP, 0,1 U/ μ l in 50 mM Tris pH 8, 0,1 mM ZnCl₂
- Puffer-AP, pH 8,0; pH 9,0; pH 9,5; pH 10,0; pH 10,5; pH 11,0; pH 11,5; pH 12,0
- Küvetten
- Photometer
- Pipetten
- Spitzen (weiß, gelb, blau)
- Eppendorfgefäße 1,5 ml

Versuchsdurchführung:

- ◆ Ansatz:
 - 100 μ l pNPP
 - 200 μ l Puffer-AP pH 8,0
 - 695 μ l H₂O (Endvolumen des Gesamtansatzes: 1000 μ l)
 - 5 μ l AP

Die Abhängigkeit der Alkalische Phosphatase Aktivität vom pH-Wert wird unter Substrat-Sättigungsbedingungen gemessen.

Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme der AP in einem 1,5 ml Epi zusammen pipettieren und mischen;

- ◆ vor Beginn der Messung alle Ansätze in beschriftete Küvetten überführen
- ◆ Küvette in Photometer, Referenz drücken \Rightarrow Photometer „genullt“
- ◆ AP in Küvette geben
- ◆ schnell mischen (Parafilmstück auf Küvette, drehen), gleichzeitig Stoppuhr starten
- ◆ alle 30 sec Extinktion messen und notieren, 4 min lang;
- ◆ Ansätze für Puffer-AP pH 9,0; pH 9,5; pH 10,0; pH 10,5; pH 11,0; pH 11,5; pH 12,0 analog ansetzen und messen
- ◆ Messung im Photometer bei **405 nm**

Messwerte sec	30	60	90	120	150	180	210	240
Puffer AP, pH 8,0								
Puffer AP, pH 9,0								
Puffer AP, pH 9,5								
Puffer AP, pH 10,0								
Puffer AP, pH 10,5								
Puffer AP, pH 11,0								
Puffer AP, pH 11,5								
Puffer AP, pH 12,0								

AP – Abhängigkeit von Temperatur, Tag 3

Alkalische Phosphatase – Abhängigkeit der Enzymaktivität (V_{max}) von der Temperatur:

Materialien

- 10 mM p-Nitrophenylphosphat
- AP, 0,1 U/ μ l in 50 mM Tris pH 8,0, 1 mM ZnCl₂
- Puffer-AP optimaler pH (selbst bestimmt)
- 1 M NaOH
- Küvetten
- Photometer
- Pipetten
- Spitzen (weiß, gelb, blau)
- Eppendorfgefäße 1,5 ml

Versuchsdurchführung:

◆ Ansatz:

100	μ l	pNPP
200	μ l	Puffer-AP optimaler pH
595	μ l	H ₂ O (Endvolumen des Gesamtansatzes: 900 μl ohne NaOH)
5	μ l	AP

Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme der AP in einem 1,5 ml Epi zusammen pipettieren und mischen;

- ◆ Epis im entsprechendem Wasserbad oder Heizblock vorwärmen (ca. 10 min) getestet werden: RT (auf der bench); 37°C; 50°C; 65°C; 80°C; 90°C;
- ◆ AP zugeben, mischen, Stoppuhr starten, **Epi zurück in Heizblock**;
- ◆ 1 min inkubieren (exakt), 100 μ l 1 M NaOH zugeben, mischen, bei RT stehen lassen, bis die Reaktionen bei allen Temperaturen durchgeführt sind;
- ◆ **Als Referenz einen Ansatz ohne AP identisch behandeln (ebenfalls bei der entsprechenden Temperatur inkubieren und 100 μ l 1 M NaOH zugeben); jede Temperatur hat ihren eigenen Referenzansatz! (Warum ist das wichtig?)**
- ◆ alle Ansätze in beschriftete Küvetten überführen
- ◆ Referenz-Küvette in Photometer, Referenz drücken \Rightarrow Photometer „genullt“
- ◆ Ansatz mit AP messen und $\Delta\varepsilon$ notieren;
- ◆ Nächste Referenz in Photometer, Referenz drücken...
- ◆ ...
- ◆ Messung im Photometer bei **405 nm**

AP – Abhängigkeit vom Salzgehalt, Tag 3

Alkalische Phosphatase – Abhängigkeit der Enzymaktivität (V_{max}) von verschiedenen Salzen:

Materialien

- 10 mM p-Nitrophenylphosphat
- AP, 0,1 U/ μ l in 50 mM Tris pH 8,0, 1 mM $ZnCl_2$
- Puffer-AP optimaler pH (selbst bestimmt)
- 1 M NaOH
- 0,5 M EDTA
- 0,5 M Na-Phosphat Puffer pH 10,0
- 5 M NaCl
- 0,5 M Na_2CO_3
- Küvetten
- Photometer
- Pipetten
- Spitzen (weiß, gelb, blau)
- Eppendorfgefäße 1,5 ml

Versuchsdurchführung:

- ◆ Ansatz:

100	μ l	pNPP
200	μ l	Puffer-AP optimaler pH
y	μ l	Salzlösung
595-y	μ l	H_2O (Endvolumen des Gesamtansatzes: 900 μl ohne NaOH)
5	μ l	AP

Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme der AP in einem 1,5 ml Epi zusammen pipettieren und mischen;

- ◆ Je zwei Ansätze einstellen auf (1 Ansatz dient als Referenz, der 2. wird gemessen)
 - 50 mM EDTA und 100 mM EDTA
 - 25 mM NaCl und 50 mM NaCl und 500 mM NaCl
 - 10 mM Na-Phosphat und 50 mM Na-Phosphat und 100 mM Na-Phosphat
 - 50 mM Na_2CO_3
 - **ohne Salz (Vergleichswert)**(Achtung: **Salzkonzentration berechnen auf Reaktionsvolumen = 900 μ l**)

Insgesamt werden 2 x 10 Ansätze vorbereitet!

- ◆ Beide Ansätze einer Salzkonzentration im 37 °C Heizblock vorwärmen (ca. 10 min)
- ◆ Zu einem der vorgewärmten Ansätze AP zugeben, mischen, Stoppuhr starten, Eppi zurück in Heizblock/Wasserbad;
- ◆ 1 min inkubieren (exakt), 100 μ l 1 M NaOH zugeben (zu beiden Ansätzen, dem mit und dem ohne AP), mischen, bei RT stehen lassen, bis die Reaktionen für alle Salzkonzentrationen durchgeführt sind;
- ◆ alle Ansätze in beschriftete Küvetten überführen
- ◆ Referenz-Küvette zu Ansatz X in Photometer, Referenz drücken \Rightarrow Photometer „genullt“
- ◆ Ansatz X in Photometer messen und $\Delta\epsilon$ notieren;
- ◆ Alle Ansätze analog messen und $\Delta\epsilon$ notieren;
- ◆ Messung im Photometer bei **405 nm**

Anzusetzende Puffer

Substrate und Eichlösungen, ansetzen von jeder Gruppe:

0,3 M Ethanol p.A.;	(MW: 46,07 g mol ⁻¹ ; D: 0,79 g cm ⁻³)	25 ml
0,6 M 1-Propanol p.A.;	(MW: 60,1 g mol ⁻¹ ; D: 0,8 g cm ⁻³)	20 ml
15 mM Fomepizol,	(MW: 82,1 g mol ⁻¹ ; D: 0,99 g cm ⁻³)	3 ml
0,1 % (v/v) Ethanollösung		1 ml
0,2 % (v/v) Ethanollösung		1 ml
0,3 % (v/v) Ethanollösung		1 ml
0,4 % (v/v) Ethanollösung		1 ml
0,5 % (v/v) Ethanollösung		1 ml
0,75 % (v/v) Ethanollösung		1 ml
1,0 % (v/v) Ethanollösung		1 ml

Vorhandene Puffer

Enzymkinetik - Vorhandene Puffer und Lösungen:

Puffer ADH:

200	mM	Na-Pyrophosphat	(MW: 265,90 g mol ⁻¹)
120	mM	Glycin	(MW: 75,07 g mol ⁻¹)
60	mM	Semicarbazid	(MW: 111,53 g mol ⁻¹)

Puffer-AP:

250	mM	Natriumacetat	(MW: 82,03 g mol ⁻¹)
250	mM	Imidazol	(MW: 68,08 g mol ⁻¹)
250	mM	Borsäure	(MW: 61,8 g mol ⁻¹)

titriert mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf pH 8,0; pH 9,0; pH 9,5; pH 10,0; pH 10,5; pH 11,0; pH 11,5; pH 12,0

- ◆ 30 mM NAD, (MW: 663,4 g mol⁻¹) gelöst in 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0
je 8 ml pro Gruppe
- ◆ 0,25 M Glutathion pH 9,0, (MW: 307,3 g mol⁻¹)
je 6 ml pro Gruppe
Achtung! Glutathion und NAD soll vom nächsten Praktikumskurs weiterverwendet werden.
Immer kühlen, nur mit frischen Spitzen pipettieren!
- ◆ ADH, 1 : (xxxx) verdünnt in 0,1 % BSA (w/v) je 2 ml pro Gruppe/Tag
- ◆ Alkalische Phosphatase 0,1 Unit/μl 200 μl pro Gruppe/Tag
- ◆ 10 mM p-Nitrophenylphosphat je 6 ml pro Gruppe

Protokoll zur Woche Enzym Kinetik

Protokoll zum Grundpraktikum Biochemie – Woche Enzymkinetik

Bitte schreiben sie 1 ½ zeilig mit Schriftgröße 11 – 12 Punkt!

Achtung: Alle (abgezeichneten) Original -Messdaten als Anhang zum Protokoll beilegen!

Schreiben Sie zu folgenden Themen jeweils ca. 1 ½ Seiten „Einleitung“. Die Einleitung soll kurz auf die theoretischen Inhalte der Versuche eingehen und mit einer kurzen Zusammenfassung was Sie mit welcher Zielsetzung gemacht haben, enden. Schreiben Sie nicht wesentlich mehr als 1 ½ Seiten; nach 2 Seiten werden wir aufhören zu lesen und zu korrigieren.

Themen:

1. ADH – Analyse der Substratspezifität, Inhibitorwirkung und Alkoholbestimmung
2. AP – Einfluss äußerer Faktoren auf die Enzymaktivität (pH-Wert, Temperatur, Salze)

Alkoholdehydrogenase – Substratspezifität

Berechnung der hergestellten Substrat / Inhibitor - Lösungen:

Endkonzentration	eingesetzt: ml Stocklösung / g Feststoff:
300 mM Ethanol, 25 ml	(MW: 46,07; D: 0,79)
600 mM 1-Propanol, 20 ml	(MW: 60,1; D: 0,8)
15 mM Fomepizol, 3 ml	(MW: 82,1; D: 0,99)

Substratspezifität der ADH:

1. Erstellen Sie eine Tabelle mit folgenden Daten:
 - Originalmessdaten Ihrer Messwerte für Ethanol
 - Berechnung $\Delta E/\text{min}$
 - Reaktionsgeschwindigkeit v in $\text{Mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ für jede Substratkonzentration ($\epsilon_{\text{NADH}} = 3427 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 - $1/v$
 - $1/[S]$

Achtung: Geben Sie bitte alle Konzentrationen in M (Mol L^{-1}) an. Reaktionsgeschwindigkeit in $\text{Mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$!!!

2. Erstellen Sie analoge Tabellen zu folgenden Messwerten:
 - Mittelwerte der Ethanol-Messreihen für den gesamten Kurs (Daten auf Moodle)
 - Originaldaten Ihrer Messwerte für Propanol
 - Mittelwerte der Propanol-Messreihen für den gesamten Kurs (Daten auf Moodle)

Bei der Formatierung der Tabelle sollten Sie darauf achten, dass die Daten übersichtlich und leicht zu zuordnen dargestellt werden. Ziehen Sie die Verwendung von Querformat für die Tabellen in Betracht.

Protokoll zur Woche Enzym Kinetik

- Erstellen Sie Lineweaver-Burk-Diagramme für Ethanol und Propanol, indem Sie $1/v$ gegen $1/[S]$ auftragen (Millimeterpapier oder Exceltabelle und –Grafik). Erstellen Sie jeweils ein Diagramm für Ihre Originaldaten und die Mittelwert-Kursdaten (insgesamt 4 Diagramme; die Geraden für Ethanol, Originaldaten und Mittelwert-Kursdaten, bzw. Propanol, Originaldaten und Mittelwert-Kursdaten, können jeweils in ein Diagramm eingetragen werden, müssen aber nicht).
- Bestimmen Sie aus den Diagrammen V_{\max} und K_M für Ethanol Originaldaten und Ethanol Mittelwert-Kursdaten und berechnen Sie jeweils die Wechselzahl k_3 (sec^{-1}) für das Enzymmolekül und die einzelne katalytische Untereinheit.
- Bestimmen Sie aus den Diagrammen V_{\max} und K_M für Propanol Originaldaten und Propanol Mittelwert-Kursdaten und berechnen Sie jeweils die Wechselzahl k_3 (sec^{-1}) für das Enzymmolekül und die einzelne katalytische Untereinheit.
- Vergleichen Sie die für Ihre Originaldaten ermittelten Werte (V_{\max} , K_M , k_3) mit denen für die Mittelwert-Kursdaten ermittelten Werte sowohl für Ethanol als auch für Propanol und diskutieren Sie etwaige Abweichungen. Welcher der Datensätze ist zuverlässiger? Warum?
- Vergleichen Sie die Werte für Ethanol und Propanol. Was ist das bessere Substrat? Was bedeutet „besseres Substrat“ mechanistisch?

K_M in $\text{Mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ angeben!

Wechselzahl k_3 in sec^{-1}

MW ADH: 148 kDa (= 148000 g mol⁻¹)

Stocklösung ADH: wird in der Abschlussbesprechung bekannt gegeben

Verdünnung ADH: wird in der Abschlussbesprechung bekannt gegeben

ADH aus Hefe enthält 4 katalytische Untereinheiten

Alkoholdehydrogenase – Hemmung der ADH

- Erstellen Sie zu jeder Messreihe eine Tabelle mit folgenden Daten:
 - Originalmessdaten Ihrer Messwerte
 - Berechnung $\Delta E/\text{min}$
 - Reaktionsgeschwindigkeit v in $\text{Mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ für jede Substratkonzentration ($\epsilon_{\text{NADH}} = 3427 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
 - $1/v$
 - $1/[S]$
- Erstellen Sie ein Lineweaver-Burk-Diagramm für jede Inhibitorkonzentration. Tragen Sie die Geraden in **EINE** Grafik ein und bestimmen Sie aus der Lage der (annähernd) gemeinsamen Schnittpunkte den Hemmtyp.
- Berechnen Sie für jede Inhibitorkonzentration die Inhibitorkonstante K_i . Bilden Sie einen (sinnvollen) Mittelwert. Berechnung Inhibitorkonstante siehe Seminar
- Ist die Inhibitorkonstante von Fomepizol größer oder kleiner als die Michaelis-Menten Konstante von Ethanol? Ist Fomepizol damit ein guter (affiner) Inhibitor?

Protokoll zur Woche Enzym Kinetik

4. Alkoholdehydrogenase – Alkoholgehalt einer Kirschlikörpraline

1. Erstellen Sie für Ihre Eichmessungen und Likörmessungen/Alkoholbestimmungen eine Tabelle mit den Originaldaten.
2. Erstellen Sie mit den Werten der Ethanol-Standards eine Eichgerade (Extinktion gegen Konzentration auftragen). Falls Sie Excel verwenden: Achten Sie auf die Erstellung einer SINNVOLLEN Ausgleichsgeraden.
3. Bilden Sie aus den Messwerten der Pralinenprobe/Alkoholprobe einen Mittelwert (Verdünnung einberechnen) und lesen Sie die Alkoholkonzentration der Probe aus der Eichgerade ab. Der Alkoholgehalt eines Likörs beträgt 15%, 22 % oder 40 %. Stimmt dies mit Ihrer Messung überein? Wenn nein, diskutieren Sie mögliche Fehlerquellen

Alkalische Phosphatase – pH-Wert Abhängigkeit, Temperaturabhängigkeit und Salzabhängigkeit der Enzymaktivität

Versuchsauswertung:

1. Erstellen Sie eine Tabelle der Extinktionswerte zu Reaktionszeit bei den unterschiedlichen pH-Werten (es kann die Originaltabelle aus dem Script verwendet/eingeklebt werden).
2. Tragen Sie für die verschiedenen pH-Werte die Extinktion gegen die Zeit in ein Diagramm ein und bestimmen Sie die Reaktionsgeschwindigkeit (Extinktion pro min) als Geradensteigung. Berücksichtigen Sie dabei nur den linearen Bereich der Messung.
3. Tragen Sie die Reaktionsgeschwindigkeiten gegen den pH-Wert auf. Wo liegt das pH-Optimum der alkalischen Phosphatase?
4. Erstellen sie eine Tabelle mit Ihren Messwerten bei den unterschiedlichen Temperaturen. Bei welcher Temperatur ist die AP Aktivität am höchsten? Würden Sie dieses Temperaturoptimum für ein Enzym aus Kalb erwarten.
5. Erstellen Sie eine Tabelle mit Ihren Messwerten bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Welchen Einfluss hat welches Salz auf die AP Aktivität? Warum?

Falls Ihre Ergebnisse nicht mit den erwarteten übereinstimmen, diskutieren Sie bitte jeweils kurz mögliche Ursachen/Erklärungen.