

## Pflichtqualifikationseinheit lfd. Nr. 10 „Durchführung biochemischer Arbeiten I“

Laut Ausbildungsrahmenplan zu vermittelnde Fertigkeiten und Kenntnisse:

- a) Fotometrische und chromatografische Methoden anwenden
- b) Enzymatische Analysen durchführen
- c) Biologisches Material aufarbeiten
- d) Proteingemische elektrophoretisch trennen
- e) Proteine reinigen

## Wahlqualifikationseinheit lfd. Nr. 14 „Durchführen immunologischer und biochemischer Arbeiten“

Laut Ausbildungsrahmenplan zu vermittelnde Fertigkeiten und Kenntnisse:

- b) Antikörper gewinnen (und Titer bestimmen)
- d) Proteine durch Blottingverfahren identifizieren

### Beispiel für eine betriebliche Umsetzung

#### Gliederung der Umsetzungshilfe

- [Organisatorische](#) und sicherheitstechnische Hinweise
- [Übersicht über die vermittelten Praxis- und Theorieinhalte](#)
- [Verwendete Materialien / Medien](#)
- [Arbeitsanweisungen und Hinweise für Ausbilder/innen](#)

#### Weitere Hinweise

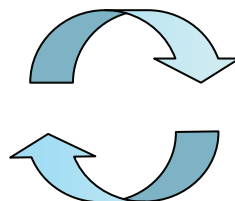
Die in diesen Umsetzungshilfen genannten Inhalte werden für alle Auszubildenden eines Lehrjahres im Ausbildungslabor vermittelt und durch die Aufenthalte in den einzelnen Forschungsabteilungen vertieft und geübt.

Arbeitsanweisungen werden nicht für alle Versuchsteile eingesetzt, sondern die durchzuführenden Praxisinhalte werden teils auch gemeinsam entwickelt. Zur Vertiefung der Fremdsprachenkenntnisse kommen auch englischsprachige Arbeitsvorschriften und Produktinformationen zur Anwendung.

Antikörpergewinnung und Blotting-Verfahren - Inhalte, die in den Bereich der Wahlqualifikation einzuordnen sind – werden in diesem Beispiel bereits im Rahmen der Pflichtqualifikation durchgeführt, da hier betriebliche Belange dafür sprechen.

#### Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan  
Nr. 10, 11.1 e, 14  
in Verbindung mit Nrn.  
5b, 6.1 – 6.4](#)



#### Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfelder  
6, 12  
In Verbindung mit Lernfeldern  
1 - 5](#)

## Organisatorische Hinweise:

Die geforderten Inhalte können mit zwei Versuchen erfüllt werden:

### [A Charakterisierung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase](#)

### [B Aufreinigung von IgG aus Ratten-Vollblut](#)

Das zur **Aufreinigung von IgG** aus Rattenserum notwendige Blut wird aus vorhergegangenen Sektionen gewonnen, bei denen die Tiere durch Entbluten an der arteria abdominalis getötet werden. Darum muss das Serum schon zu diesem Zeitpunkt gewonnen und im Gefrierschrank gelagert werden.

Wenn Ihnen keine Tiere zur Verfügung stehen, so können Sie sicherlich bei Ihrem Kooperationspartner für die zoologischen Ausbildungsinhalte Serum bekommen, oder dieses alternativ im Handel beziehen.

Im Beispiel stellen wir unsere Gele für die SDS-PAGE selbst her, weil zugleich auch der Umgang mit **CMR-Substanzen** geübt wird. Hierfür ist eine Belehrung gemäß § 14 Gefahrstoffverordnung notwendig. Bei der Durchführung ist besonders auf die Einhaltung der Bestimmungen zur Arbeitssicherheit zu achten.

Bei Verwendung von Fertiggelen muss die Vorschrift entsprechend angepasst werden.

## Theoretische und praktische Inhalte zur Pflichtqualifikationseinheit lfd. Nr. 10 „Durchführung biochemischer Arbeiten I“

### a) Fotometrische und chromatografische Methoden anwenden

Theorie: Wiederholung der Inhalte: Photometrie und Chromatographie aus dem Labortechnischen Grundpraktikum.  
Besprechung Bradford Bestimmung.

Praxis: Kennen lernen des Microplate-Readers,  
Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford  
Bestimmung des Nitrophenols (Enzym-Versuche) im Linien- und im Spektralfotometer.

### b) Enzymatische Analysen durchführen

Theorie: Allgemeine Enzymatik, Substrat- u. Wirksamkeit, Michaelis-Menten-Gleichung, Lineweaver-Burk-Diagramm, Enzymhemmung  
Parameter pH, Temperatur, Substratkonzentration... .

Praxis: Erstellen eines Lineweaver-Burk Diagramms mit alkalischer Phosphatase. Bestimmung von pH und Temperaturoptimum, Test des Enzyms auf Hemmung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Metallsalzen und/oder EDTA.

### c) Biologisches Material aufarbeiten

Theorie: Wiederholung der Inhalte: Blutgerinnungssystem, Serumgewinnung, Probennahme, Kühlen der Proben... .  
Einführung Fällung von Proteinen

Praxis: Serumgewinnung, Proteinfällung.

### d) Proteingemische elektrophoretisch trennen

Theorie: Überblick über elektrophoretische Methoden, Einführung in SDS-PAGE, besondere Einweisung in den Umgang mit CMR-Substanzen.

Praxis: Zur Überprüfung der IgG-Reinheit wird eine SDS-PAGE durchgeführt.

### e) Proteine reinigen

Theorie: Einführung in Proteinreinigungsstrategien. Z. Teil im Selbststudium.  
Gute Hilfe: Der Experimentator Proteinbiochemie/Spektrum-Verlag.

Praxis: Entsalzen-Gelfiltration, Affinitätschromatographie, Ultrafiltration.

**Zusätzliche theoretische und praktische Inhalte  
zur Wahlqualifikationseinheit lfd. Nr. 14:  
„Durchführen immunologischer und biochemischer Arbeiten“**

**b) Antikörper gewinnen (und Titer bestimmen)**

Alle oben beschriebenen Inhalte und Tätigkeiten.

**d) Proteine durch Blottingverfahren identifizieren**

Theorie: Antikörper-Reaktionen, Immunchemie.

Praxis: Western-Blot mit den bei der IgG-Reinigung gewonnenen Proben  
im Anschluss an die SDS-PAGE.

## Materialien und Geräte:

### A. Enzymaktivität:

- Alkalische Phosphatase, lyophilisiert
- Para-Nitrophenylphosphat
- NaCl + Glycin für Puffer nach Soerensen (s. Tabellenanhang)
- Ca. 0,1 mol/L NaOH
- Dispenser
- Eppendorfpipetten und Spitzen
- Multistepper und Spitzen
- Spektral- oder Linienfotometer (405 nm)

### B. IgG-Reinigung:

- Ratten-Vollblut oder –Serum
  - PBS, pH 7,4
  - 0,45 µm Spritzenfilter
  - Eppendorf Reaktionsgefäße
  - Eppendorfpipetten und Spitzen
  - Serologische Pipetten und Pipettierhilfe
  - Gesättigte Ammoniumsulfatlösung (4,1 mol/L bei 25°C)
  - Eis
  - Hochgeschwindigkeits-Kühl-Zentrifuge, mit Rotor und Bechern
  - Tris-Puffer, pH 9 nach Gomori
  - Hi-Trap-Desalt Säule, 5 mL Pharmacia
  - 20% EtOH in Tris-Puffer, pH 9
  - Protein-A-Sepharose FF-Säule, 5 mL Pharmacia
  - NaCl + Glycin für Puffer nach Soerensen, pH 2,5
  - Zentrifugal-Filterröhrchen (100 kDa cut-off)
  - Bradford-Reagenz
  - Mikrotiterplatten-Lesegerät
  - Proteinstandard (250-10 kDa)
  - 4x Probenpuffer für SDS, reduzierend und nicht reduzierend
  - Trenn- und Sammelgelpuffer, Acrylamid-Lösung (30 %, 37,5:1 Bis), alternativ
  - Fertig-Gele, 4-12%
  - BioRad Protean II Elektrophorese-Einheit (mit Gel-Gieß-Zubehör)
  - Laufpuffer
  - Coomassie-Färbung und –Entfärbung-Lösung
  - Transferpuffer
  - Nitrocellulose-Membran und Whatman-Filterpapier
  - BioRad Semi-dry Blot-Apparatur
  - Ponceau-S-Färbelösung (alternativ prestained Marker verwenden)
  - Evtl. Folienschweißgerät
  - Blockpuffer (PBS, pH 7.3/0,05% Tween 20/4% Magermilchpulver)
  - Waschpuffer (PBS, pH 7.3/0,05% Tween 20)
  - AP konjug. rabbit anti-rat IgG (H+L)
  - NBT/BCIP Tabletten für Blot-Entwicklung
-



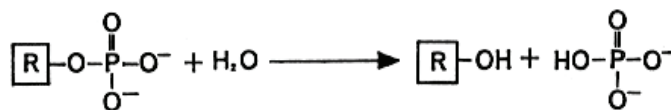
## A Enzymaktivität

### 1. Grundlagen:

Die Alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung von Phosphat aus phosphathaltigen Verbindungen. Zur Darstellung der Enzymtätigkeit (Enzymaktivität) findet Nitrophenylphosphat als Substrat Verwendung, da dessen Spaltprodukt Nitrophenol in der Na-Salzform bei 405 nm gut absorbiert und deshalb noch in mikromolaren Konzentrationen nachweisbar ist.

#### Enzymreaktion: hydrolytische Spaltung von Nitrophenolphosphat

Die Phosphatasen (alkalisch/sauer) gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen:



$\boxed{\text{R}}$  = Alkoholischer bzw. phenolischer Rest  
z.B.  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Glycerophosphat  
Phenylphosphat  
p-Nitrophenylphosphat  
Phenolphthaleinphosphat

Erfassung der Enzymaktivität durch Messen des freigesetzten Phosphats oder von R-OH (Phenol, p-Nitrophenol, Phenolphthalein)

### 2. Der Bestimmungsansatz

Der Inkubationsansatz setzt sich für alle Versuche in diesem Arbeitsthema folgendermaßen zusammen:

#### Ansatz im Reagenzglas [mL]

Reagenzlösung	Bestimmungsansatz	Reagenzienleerwert* (RLW) Blindhydrolyse*
a) Pufferlösung	1,50	1,50
b) Substratlösung	0,40	0,40
c) Enzymlösung	0,10	0,10*)
Inkubationsvolumen	2,00	2,00

#### \*) Reagenzienleerwert, Blindhydrolyse:

Neben der Eigenextinktion des schwach gelb gefärbten Substrates kann mit dem RLW auch das Ausmaß der nichtenzymatischen Hydrolyse (Blindhydrolyse) des Nitrophenylphosphates zu Nitrophenol bestimmt werden. Bei hohen Substratkonzentrationen oder hoher Inkubationstemperatur steigt die Blindhydrolyse derart an, dass sie nicht mehr vernachlässigt werden kann. Bei den verschiedenen Ansätzen zur Ermittlung der Blindhydrolyse wird das Enzym erst nach Inkubation und NaOH-Zugabe einpipettiert.

Erläuterungen zum Inkubationsansatz:

- zu a) Die Herstellung der Pufferlösung, auch für verschiedene pH-Werte, erfolgt mit Hilfe der Puffertabelle, Rauscher 162 ff.  
Alkalische Phosphatase: Glycin-Puffer nach Sørensen (s. Tabelle)
- zu b) Für die Ermittlung des pH- und Temperatur-Optimums wird die Substratkonzentration gewählt, die eine maximale Enzymaktivität gewährleistet.
- zu c) Das Enzym wird für jeden Versuch in frischer Lösung eingesetzt (physiolog. NaCl). Einsatz: 20 mU Phosphatase

**Merke:** Sobald Enzym zugegeben ist, läuft die Zeituhr für die Inkubationsdauer, in jedem Versuch 30 min!!

Bei allen Inkubationsansätzen wird sofort nach Abschluss der Inkubation alkalisiert: Pro Reagenzglas werden mit dem Dispenser 8 mL 0.1 mol/L NaOH zugegeben. Hierdurch wird das Enzym inaktiviert und die kolorimetrisch messbare Na-Salzform des freigesetzten Nitrophenols gebildet.

Auswertung:

Die Enzymaktivität wird beschrieben mit der Umsatzgeschwindigkeit  $v$  als Zunahme des Spaltproduktes pro Zeiteinheit.

Die Bestimmung der Phosphatasen-Aktivität wird möglich durch den kolorimetrischen Nachweis des freigesetzten Nitrophenols:

Die Menge des gebildeten Nitrophenols lässt sich schnell mit Hilfe des mol. Extinktionskoeffizienten ( $1,8 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes aus der Extinktion des jeweiligen Inkubationsansatzes berechnen.

### 3. **Arbeitsauftrag:**

#### 3.1 Erstellung eines **Lineweaver-Burk-Diagramms** für alk. Phosphatase:

Enzym/Ansatz: 20 mU

Substratkonzentrationen:

30  $\mu\text{mol/L}$ , 60  $\mu\text{mol/L}$ , 125  $\mu\text{mol/L}$ , 250  $\mu\text{mol/L}$ , 500  $\mu\text{mol/L}$ , 1  $\text{mmol/L}$ , 2  $\text{mmol/L}$ ,  
4  $\text{mmol/L}$ , 8  $\text{mmol/L}$

Puffer pH 9.6

#### 3.2 Bestimmung des **Temperaturoptimums** für alk. Phosphatase:

An möglichst vielen Punkten zwischen 10°C und 70°C wird die Reaktionsgeschwindigkeit in  $\text{nmol/min}$  bestimmt und graphisch dargestellt.

Enzym: 20 mU; Substrat 5  $\text{mmol/L}$

Puffer pH 9.6

#### 3.3 Bestimmung des **pH-Optimums** der alk. Phosphatase:

Zwischen pH 8.6 und 11.6 wird in 0.2 pH-Schritten die Reaktionsgeschwindigkeit in  $\text{nmol/min}$  bestimmt und graphisch dargestellt.

Enzym: 20 mU; Substrat 5  $\text{mmol/L}$

Glycin-Puffer nach Sørensen (s. Tabelle)

### **Hinweise für Ausbilder/innen:**

Dieser Versuch eignet sich gut, um den Umgang mit Puffertabellen zu erlernen. Die Konzentrationsangaben, eingesetzte Volumina und die notwendigen Rechenschritte zur Auswertung vertiefen die Rechenkünste der Auszubildenden.

Als 4. Arbeitsschritt wäre es sinnvoll, mit EDTA und  $\text{MgCl}_2$  oder  $\text{ZnCl}_2$  Hemmkonzentrationen auszutesten (Alkalische Phosphatase braucht Mg/Zn). Diesen Teil können die Azubis selbst erarbeiten.

## B Aufreinigung von IgG aus Ratten-Vollblut

In diesem Versuch soll aus Ratten-Serum reines IgG gewonnen werden. Folgende Methoden kommen zur Anwendung:

Berufsbild-Position	Inhalt, Tätigkeit	Arbeitsschritt
6.1 b, 6.4 b, 10 c	Serum aus Vollblut gewinnen	<u>1</u>
6.4, 10 c,e	Fraktionierte Fällung	<u>2</u>
6.3 c, 10 a,e	Entsalzung mittels Gelfiltration	<u>3</u>
10 a	Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose	<u>4</u>
5 b, 6.3 b, 10 a	Proteinbestimmung nach Bradford zur Quantifizierung der Proteinkonzentrationen der Fraktionen aus c) und der vorangegangenen Arbeitsschritte	<u>5</u>
5 b, 6.2 c, 10 d	SDS-PAGE zur Überprüfung der Aufreinigungsschritte	<u>6</u>
11.1 e	Westernblot mit spezifischer Antikörperreaktion zum Nachweis, dass das gereinigte Protein tatsächlich IgG ist	<u>7</u>

### 1. Gewinnung, Verdünnung + Filtration von Ratten-Serum

Bei einer vorhergegangenen Sektion wurden etwa 8 mL Vollblut aus der arteria abdominalis einer Ratte gewonnen. 20 min bei RT Koagulierung, anschließend 2 h Kühschrank. Zentrifugation 15 min bei 400 g nach vorsichtigem Ablösen des Blutkuchens von der Röhrchenwand. Abheben des Serums mit Pipette.

Das Serum wird mit demselben Volumen PBS (pH 7,4) gemischt und filtriert (0.45 µm Spritzenfilter). Davon werden ca. 0.3 mL für Proteinbestimmung und SDS-PAGE bei 4°C gelagert =RM1.

### 2. Ausfällen von Immunglobulinen aus Rattenserum.

- Serum besteht zu 90% aus Wasser, in dem verschiedene Salze, Mineralien, Proteine, Fette, Zucker u.a. gelöst sind.
- Das häufigste im Serum gelöste Protein ist das Albumin, weiter sind Immunglobuline, Fibrinogen, Gerinnungsfaktoren u.v.a. Proteine enthalten.
- Durch seine hohe Löslichkeit fällt Albumin erst bei sehr hohen Salzkonzentrationen aus.

## Durchführung

- Durch eine fraktionierte Fällung sollen zuerst die schlecht löslichen Proteine bei einer  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Konzentration von 1,37 M ausgefällt werden. Dies wird erreicht durch Zugabe einer entsprechenden Menge gesättigter Ammoniumsulfatlösung (4.1 M bei 25°C).
- Unter Rühren 30 min auf Eis inkubieren, 20 min bei 12000 g, 4°C zentrifugieren, Pellet verwerfen.
- Anschließend werden die im Überstand verbliebenen Immunglobuline durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 2,05 M ausgefällt. (Das Albumin bleibt im Überstand, der verworfen wird.) Unter Rühren 30 min auf Eis inkubieren, 20 min bei 12000 g, 4°C zentrifugieren.
- Pellet in möglichst kleiner Menge Tris/HCl-Puffer pH 9 (s. Tabelle) lösen. Nicht lösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernen (20 min 12000 g bei 4°C).
- 0.3 mL werden für Proteinbestimmung und für die SDS-PAGE bei 4°C gelagert =RM2.

## 3., 4. Entsalzung und Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose

Für die affinitätschromatographische Isolierung von IgG ist kovalent an Sepharose gebundenes Protein A besonders gut geeignet. Dieses Protein von *Staphylococcus aureus* hat eine Masse von  $4,2 \times 10^4$  g/mol und ist im pH-Bereich von 1 - 12 stabil. Protein A besitzt vier hoch-homologe affine Bindungsstellen für den Fc-Teil von IgG, wobei ein Molekül zwei IgG-Moleküle binden kann. Aufgrund der IgG-bindenden Eigenschaften ist die Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose die Methode der Wahl zur Isolierung monoklonaler Antikörper.

Damit die Bindung der IgGs an die Protein A-Sepharose funktionieren kann, ist es nötig, die gefällten Proteine zu entsalzen. Dies geschieht mittels Gelfiltration auf einer Sephadex-G25 enthaltenden Hi-Trap-Desalt Säule der Firma Pharmacia:

### 3. Durchführung der Entsalzung:

- Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Säule nicht trocken läuft.
- Die Entsalzungssäule wird zunächst mit 25 mL (=5 cv) Tris-Puffer pH 9 äquilibriert (2 Tropfen/sec).
- Dann wird genau 1.5 mL der Probe (1 Tropfen/sec) aufgetragen.
- Anschließend wird die Säule wiederum mit 25 mL Tris-Puffer pH 9 gespült, wovon die zuerst austretenden 2 mL in einem Eppendorfgefäß aufgefangen werden müssen. Diese enthalten alle Proteine der Probe.
- Ist noch mehr Probe vorhanden, so wird sie mit Tris-Puffer pH 9 auf genau 1.5 mL verdünnt und ebenfalls entsalzt.
- Nach Abschluss des Reäquilibrierens wird die Säule mit 25 mL Tris-Puffer /20 % EtOH pH 9 gespült, und so zur Lagerung im Kühlschrank vorbereitet.

#### 4. Durchführung der Affinitätschromatographie:

- Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Säule nicht trocken läuft.
- Auf die Geloberfläche der mit 25 mL Tris-Puffer pH 9 äquilibrierten Säule wird maximal 1 ml der Probe (max. 40 mg Protein) aufgetragen.
- die Probe wandert in das Gel ein.
- Durch Zugabe von Tris-Puffer pH 9 werden die nichtbindenden Proteine eluiert ( 3 Säulenvolumina).
- Danach wird die Säule mit Ablösepuffer (Glycin-Puffer nach Soerensen, pH 2,5, s. Tabelle) eluiert. Es werden 12 Fraktionen à 2 mL gesammelt.
- Die Säule wird nun mit Tris-Puffer pH 9 reäquilibriert (Kontrolle mit Indikatorpapier). Die Säule ist jetzt für weitere Trennungen einsetzbar.
- Nach Beendigung aller Trennläufe wird die Säule ebenfalls mit 25 mL Tris pH 9/20 % EtOH gespült.
- In den Fraktionen wird die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.
- Die Proteinhaltigen Eluate werden gepoolt und mittels UltraFilter-Zentrifugation (Angaben des Herstellers beachten!) eingeeengt.

## 5. Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford

Es gibt verschiedene Methoden der Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Im einfachsten Fall nutzt man die in Proteinen vorhandenen aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan und misst deren charakteristische Absorption bei 280 nm. Da der Gehalt an diesen Aminosäuren von Protein zu Protein variiert, ist dieses Vorgehen nur bedingt zur Quantifizierung von Proteinen geeignet.

Der Proteinbestimmung nach Bradford liegt eine Farbreaktion zugrunde. Der Nachweis beruht auf der spezifischen, hydrophoben und elektrostatischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G bevorzugt an Argininresten der Proteine. Bei der Bildung des Farbstoff-Proteinkomplexes wird insbesondere die anionische Form des Farbstoffes stabilisiert, und dadurch eine Absorptionsmessung bei 595 nm in Anwesenheit des freien Farbstoffes ermöglicht. Die Nachweisgrenze der Bradford-Methode unter optimalen Bedingungen liegt im 1 ml-Assay unter 1 µg Protein. Dazu ist jedoch notwendig, dass die Probe relativ frei von Detergentien wie SDS, Triton X100 und Nonidet P-40 ist.

*(Bradford-Lösung:*

*100 mg Coomassie Blue G 250 werden in 50 ml 95% (v/v) Ethanol und 100 ml 85% (w/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gelöst, mit bidest. H<sub>2</sub>O wird auf 1000 ml aufgefüllt und filtriert. Die Lösung wird in einer braunen Flasche im Kühlschrank aufbewahrt (1 Jahr Haltbarkeit).)*

**Wir verwenden die Fertiglösung von Bio-Rad!**

**Protein-Standardlösungen:**

Aus einer 1 mg/ml Globulin-Stammlösung in H<sub>2</sub>O (bovine γ-Globulin aus Cohn's fractopn II,III) durch Verdünnung herstellen:

0.05; 0.1; 0.2; 0.4 mg/ml

## 5.1 Standardprotokoll für Mikotiterplatten

1. Färbereagens herstellen: 1 Teil Reagens-Konzentrat mit 4 Teilen ddH<sub>2</sub>O verdünnen. Filtration über ein 0,45 µm Spritzenfilter oder Membranfiltration. Haltbarkeit dieser Lösung 2 Wochen bei RT.
2. Verdünnungsreihe der Standardproteine herstellen (Globulin für IgG-Präparation). Der Test ist im Bereich von 0,05 bis 0,5 mg/mL linear. Normalerweise werden Doppelt- oder Dreifachbestimmungen vorgenommen.
3. 10 µL von jedem Standard und jeder Probe in eigene Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Leerwert Wasser!
4. Zu jeder Vertiefung werden 200 µL des verdünnten Färbereagens pipettiert (Multistepper). Probe/Standard und Färbereagens sorgfältig mit einem Mikrotiterplatten-Schüttler mischen (abkleben!).
5. Bei Zimmertemperatur mindestens 5 min. inkubieren, und innerhalb einer Stunde Extinktion bei 595 nm am Mikroplatereader messen.

## 5.2 Microassay Procedure for Microtiter Plates

1. Prepare three to five dilutions of a protein standard, which is representative of the protein solution to be tested. The linear range of the assay is 8.0 µg/ml to approximately 80 µg/ml. Protein solutions are normally assayed in duplicate or triplicate.
2. Pipet 160 µl of each standard and sample solution into separate microtiter plate wells. Add 40 µl of dye reagent concentrate to each well. Mix the sample and reagent thoroughly using a microplate mixer.
3. Incubate at room temperature for at least 5 minutes. Absorbance will increase over time; samples should incubate at room temperature for no more than 1 hour.
4. Measure absorbance at 595 nm.

## 5.3. Auswertung:

**Erstellen Sie aus den Standard-Ansätzen Kalibriergeraden, anhand derer Sie die Konzentration der Proben bestimmen können.**

## 6. SDS-PAGE

### 6.1 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Durch Inkubation der Proteine mit SDS und S-S reduzierenden Mitteln werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine; die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Mit dieser Methode erhält man Informationen über das Molekulargewicht von Proteinmonomeren.

### 6.2 Allgemeine Anleitung für SDS-Gelelektrophorese:

Polyacrylamid-Gele werden zwischen 2 abgedichteten, speziell angefertigten Glasplatten (durch "Spacer" getrennt) gegossen. Alle Materialien müssen vor dem Zusammenbau im Gel-Gieß-Ständer mit 70% Alkohol gereinigt werden (Handschuhe). Anschließend werden die Glasplatten mitsamt der Plexiglasplattenhalterung in den Gießstand eingespannt.

Ansätze sind für jeweils 1 Biorad Mini-Protean II Gel ausgelegt. Bei größeren Gelen entsprechend hochrechnen.

**Auf der Glasplatte eine Linie für die Trenngelkante markieren, das Sammelgel soll bei kleinen Gelen 1 cm lang sein (Kamm zwischen die Glasplatten platzieren, 1 cm unterhalb der Taschengrenze markieren).**

Sofort nach dem Gießen des Trenngels wird dieses vorsichtig mit 0.3 mL Butanol überschichtet, wodurch eine waagrechte, gerade Trenngelkante gewährleistet ist. Trenngele können schon Tage im Voraus gegossen werden (Lagerung bei 4°C)! Sammelgel erst vor Gebrauch aufpolymerisieren!

Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels (20 bis 40 min bei RT, bei 4°C ca. 2-3 h) muss das Butanol mit einem Filterpapier entfernt werden. Sodann wird das Sammelgel mit den Taschen für den Probenauftrag gegossen. Vor dem Gießen des Sammelgels wird ein Kamm eingeführt; dies führt dazu, dass sich mehrere Taschen bilden, worin die Proteinlösungen aufgetragen werden.

Für die Probenvorbereitung werden die Proteinlösungen mit dem 4-fach konzentrierten Probenpuffer vermischt und 5 min bei 95 °C im Thermoblock erhitzt. Währenddessen wird die Elektrophoresekammer zusammengebaut und mit Laufpuffer gefüllt. Bis zum Auftragen der Proben werden diese nach dem Kochen auf Eis aufbewahrt. Die Proben werden mit Hilfe einer feinen Gelladespitze in die Taschen des Sammelgels pipettiert und die Elektrophorese gestartet.

Vorsicht: Beim Lauf mit hoher Gleichspannung höchste Gefahr!

Die Elektrophorese wird mit konstanter Spannung 90 V im Sammelgel und mit konstanter Spannung 120 V im Trenngel gefahren.

Nach dem Lauf wird das Gel ausgebaut und die Proteine angefärbt:

### 6.3 Coomassie Färbung

#### Färbe-Lösung (1000 ml):

2.5 g Brillant Blue R (Coomassie) in 450 mL Methanol lösen, +200 mL a. dem., +100 mL Eisessig, ad 1 L mit a. dem.. Vor Gebrauch filtrieren.

Das Polyacrylamid-Gel wird 30 min in der Färbelösung inkubiert (Taumler).

Danach erfolgen Waschungen in der Entfärberlösung, bis der Hintergrund durchsichtig ist.

#### Entfärberlösung (1000 mL):

400 mL e-Wasser + 100 mL Eisessig + 450 mL Methanol ad 1 L mit e-Wasser.  
Dieser Entfärber kann mehrfach regeneriert werden, indem er nach Gebrauch durch einen mit Aktivkohle gefüllten Faltenfilter gegossen wird.

Zum Trocknen können die Gele mit "Einmachfolie" in einem speziellen Rahmen eingespannt werden. Vor dem Einspannen das Gel in 20% Methanol/10 % Glycerin schütteln. Das Trocknen dauert mindestens 3-4 Tage. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen die beiden Folien geraten.

## 6.4 Pufferlösungen für SDS-PAGE

### 4x Sammelgelpuffer pH 6.8:

0.5 M TRIS (MW=121.1)

HERSTELLUNG: Tris in 0.6 Volumen H<sub>2</sub>O bidest lösen. pH mit HCl auf 6.8 einstellen (22-25°C). Endvolumen mit H<sub>2</sub>O bidest einstellen. Lösung mit einem 0.45 µm-Filter filtrieren. Lagerung bei 4°C.

### 4x Trenngelpuffer pH 8.8:

1.5 M TRIS (MW=121.1)

HERSTELLUNG: Tris in 0.6 Volumen H<sub>2</sub>O bidest lösen. pH mit HCl auf 8.8 einstellen (22-25°C). Endvolumen mit H<sub>2</sub>O bidest einstellen. Lösung mit einem 0.45 µm-Filter filtrieren. Lagerung bei 4°C.

### 4x Reducing Protein Loading Buffer pH 6.8:

250 mM TRIS (MW=121.1)

40 % Glycerol (δ= 1.26 g/mL)

8 % SDS

0.1 M DTT oder 5 % β-Mercaptoethanol

0.1 % Bromphenolblau (MW=691.97)

HERSTELLUNG: Chemikalien (außer Bromphenolblau) in 0.6 Volumen H<sub>2</sub>O bidest lösen. pH mit HCl auf 6.8 einstellen (22-25°C). Zugabe von Bromphenolblau. Endvolumen mit H<sub>2</sub>O bidest einstellen. Lagerung in 500µL-Aliquots bei -20°C.

### 4x Non-reducing Protein Loading Buffer pH 6.8:

250 mM TRIS (MW=121.1)

40 % Glycerol (d= 1.26 g/mL)

8 % SDS

% Bromphenolblau (MW=691.97)

HERSTELLUNG: Chemikalien (außer Bromphenolblau) in 0.6 Volumen H<sub>2</sub>O bidest lösen. pH mit HCl auf 6.8 einstellen (22-25°C). Zugabe von Bromphenolblau. Endvolumen mit H<sub>2</sub>O bidest einstellen. Lagerung in 500 µL-Aliquots bei -20°C.

### 1x TRIS-Glycin Puffer pH ca. 8.3:

25 mM TRIS (MW =121.1)

192 mM Glycin (MW=75.07)

% SDS (MW=288.38)

HERSTELLUNG: Chemikalien in 0.7 Volumen H<sub>2</sub>O bidest lösen. pH sollte bei ca. 8.3 liegen (pH nicht einstellen!!!!). Endvolumen mit H<sub>2</sub>O bidest einstellen. Lagerung bei RT oder 4°C.

**6.5 Gele gießen:****Trenngel**

Reagenzien	12 % (10-40 kDa)	10 % (21-100 kDa)	8 % (40-250kDa)
H <sub>2</sub> O bidest	3.35 mL	4.0 mL	4.65 mL
4x Trenngelpuffer	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
10 % SDS	100 µL (0.1%)	100 µL (0.1 %)	100 µL (0.1 %)
30% Acrylamidstock	4.0 mL	3.35 mL	2.7 mL
10% APS	50 µL (0.05%)	50 µL (0.05%)	50 µL (0.05%)
TEMED	5 µL (0.05%)	5 µL (0.05%)	5 µL (0.05%)
Gesamtvolumen	10 mL *	10 mL *	10 mL *

\* 10 mL sind ausreichend für 1 Trenngel (unabhängig von der Spacer-Dicke)

**Sammelgel**

Reagenzien	4 %
H <sub>2</sub> O bidest	3.00 mL
4x Sammelgelpuffer	1.25 mL
10 % SDS	50 µL (0.1%)
30% Acrylamidstock	675 µL
10% APS	25 µL (0.05%)
TEMED	5 µL (0.1%)
Gesamtvolumen	5 mL *

\* 5 mL sind ausreichend für 1 Sammelgel (unabhängig von der Spacer-Dicke)

## 6.6 Weiterverarbeitung der Proben aus der IgG-Reinigung:

Es werden jeweils auf zwei Gelen eine Spur beladen mit 20 µg Protein in je 20µL Probenlösung:

Probenpuffer  
Proteinstandard (nicht reduziert)  
Serum Präparation RM1 (nicht reduziert)  
Präzipitat RM2 (nicht reduziert)  
Eluat der Affinitätssäule (nicht reduziert)  
Probenpuffer  
Serum Präparation RM1 (reduziert)  
Präzipitat RM2 (reduziert)  
Eluat der Affinitätssäule (reduziert)  
Probenpuffer

Eines der beiden Gele wird mit Coomassie gefärbt, das andere mit der Semi-dry Apparatur geblottet (Western-Blot).

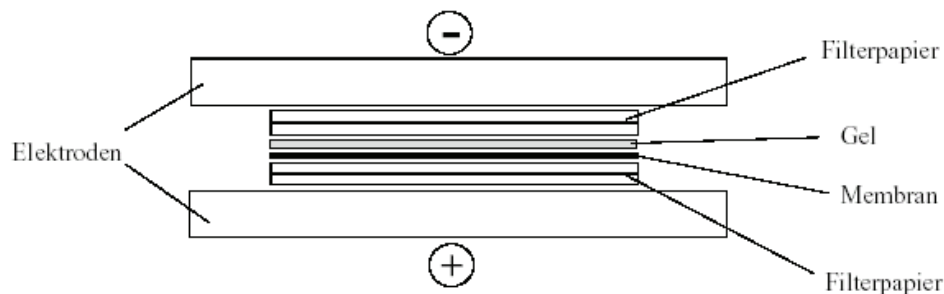
## 7 Western-Blot Durchführung:

### 7.1 Transfer der getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit der Bio-Rad Semi-dry Blot-Apparatur.

#### Transferpuffer

2.4 g Tris	25 mM Tris-HCl pH 8.3
15 g Glycin	150 mM Glycin
auf 1L mit d H <sub>2</sub> O	

1. Gel in Transferpuffer äquilibrieren (20 min, Handschuhe!)
2. Nitrocellulose-Membran (= NC) und Whatman-Filterpapier auf Gelgröße zurechtschneiden und anfeuchten (NC in H<sub>2</sub>O, Filterpapier in Transferpuffer).
3. Sandwich in Transferkammer aufbauen (bei 2 Gelen nebeneinander!): von unten nach oben: 2 x Whatman, NC (oben+re/li markieren), Gel, 2 x Whatman. Dabei wird die Luft zwischen den einzelnen Lagen mit einer Glaspipette ausgerollt (diese vorher mit 70% EtOH reinigen).
4. Transfer bei 0.8 mAmp/cm<sup>2</sup> (etwa 30 mAmp/Gel) für 1 h (PowerPac 200).
5. Membran mit ddH<sub>2</sub>O waschen, Gelreste entfernen.
6. Transfer überprüfen mit Ponceau-S-Färbung (5 min färben bei RT mit ddH<sub>2</sub>O differenzieren).
7. Auf dem Blot mit Kugelschreiber die Protein-Marker-Banden nachzeichnen, dann mit ddH<sub>2</sub>O entfärben).



## 7.2 Färbung des Blots

Blockpuffer:

4% (w/v) Magermilchpulver  
0.05% (v/v) Tween 20  
in PBS pH 7.3

Waschpuffer:

0.05% (v/v) Tween 20  
in PBS pH 7.3

## 7.3 Durchführung

1. Membran im Blockpuffer inkubieren (mindestens 30 min bei RT, geht aber auch über Nacht bei 4°C).
2. Membran 2 x waschen jeweils 5 – 10 min bei RT
3. Inkubieren mit 1:5000 verdünntem AP rabbit  $\alpha$ -rat IgG in Waschpuffer. Zu diesem Zweck wird der Blot mit der AK-Verdünnung in eine Folie eingeschweißt.
4. 2 x waschen in Waschpuffer.
5. 1 x kurz waschen in ddH<sub>2</sub>O.
6. NBT/BCIP-Lösung auf den Blot geben, Entwicklung beobachten (kann nach wenigen Minuten bis zu einer Stunde abgeschlossen sein).
7. mit ddH<sub>2</sub>O waschen.
8. zwischen Handtuchpapier trocknen.
9. Der getrockneten Blot kann im Dunkeln aufbewahrt werden (in Heft einkleben).

## 7.4 Anti-body Product Specifications

### JACKSON IMMUNORESEARCH LABORATORIES, INC

872 West Baltimore Pike  
PO Box 9  
West Grove, PA 19390

Telephone: 800-FOR-JAXN  
In PA: 215-869-4024  
Telex: 294920

dianova GmbH  
Milchstraße 3  
2000 Hamburg 13  
Tel.: (040) 4105091/92

### PRODUCT SPECIFICATIONS

**Product:** Alkaline Phosphatase conjugated AffiniPure Rabbit  
Anti-Rat IgG (H+L)

**Code Number:** 312-055-003

**Lot Number:** B043

**Physical State:** Freeze-dried powder

**Size:** 1.0 ml

**Suggested Dilution Range:** 1:5,000 - 1:50,000 for enzyme immuno-  
assays using PNPP

**Buffer:** 0.03M Tris-HCl, 0.25M NaCl, pH 8.0 (TBS)

**Stabilizer:** 15 mg/ml Bovine Serum Albumin

**Preservative:** 0.05% Sodium Azide

**Restoration and Storage:** Restore to 1.0 ml with distilled water;  
aliquot and freeze. (Do not dilute before freezing.) Expiration  
date: one year from date of restoration.

**Purity:** This product has been isolated from antisera by immuno-  
affinity chromatography using antigens coupled to agarose beads.

**Antibody Specificity:** The antibody reacts with the heavy chains on  
rat IgG and with the light chains on all rat immunoglobulins. No  
antibody was detected against non-immunoglobulin serum proteins, but  
antibodies may cross-react with immunoglobulins from other species.

**Note:** For laboratory use only, not for drug use.

**Hinweise für Ausbilder/innen:**

Für die Vorbereitung dieses Versuches sind die Auszubildenden selbst verantwortlich. Sie bekommen das Versuchsskript, weiterführende Literatur in Form von Büchern, Internetzugang, Gerätebeschreibungen der Hersteller sowie die Produktinformationen zur Verfügung gestellt, und müssen sich erst einmal einen Überblick über die Zusammenhänge verschaffen.

Daraus erarbeiten sie im ersten Schritt die Prinzipien der Versuche und erstellen eine Material-Liste. Eine schriftliche Ausarbeitung zur zeitlichen Planung muss mit dem zuständigen Ausbilder vor Beginn der praktischen Tätigkeit besprochen werden.

Eine Arbeitsgruppe sollte nicht mehr als 3 allerhöchstens 4 Azubis umfassen.

Am Ende erstellt die Gruppe gemeinsam ein Protokoll, erarbeitet Verbesserungsvorschläge und stellt Ergebnisse und Ausblick in einer ca. 10 minütigen Präsentation den anderen Auszubildenden der Gruppe vor.