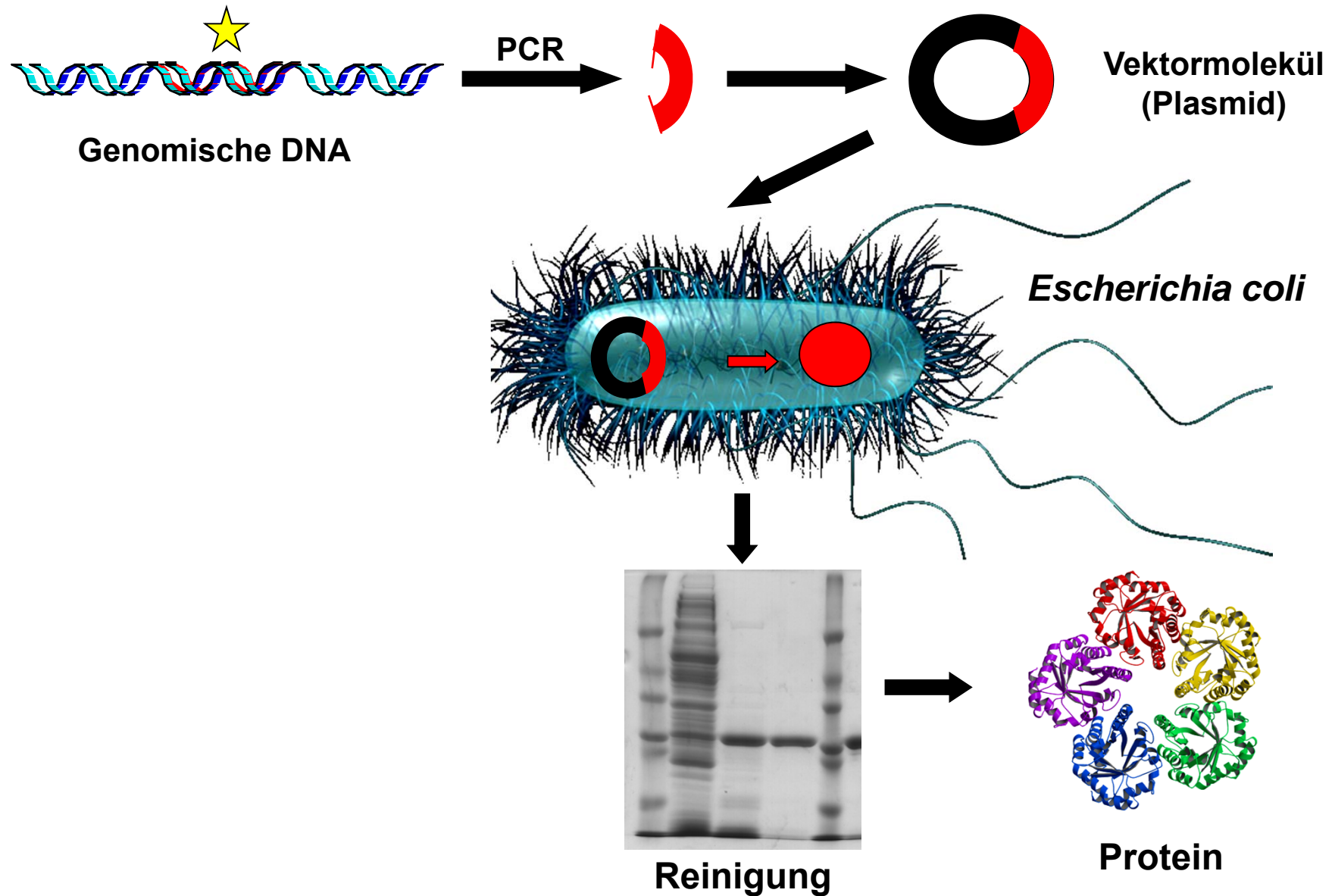


Praktikum Biochemie

„Einführung in die Molekularbiologie“

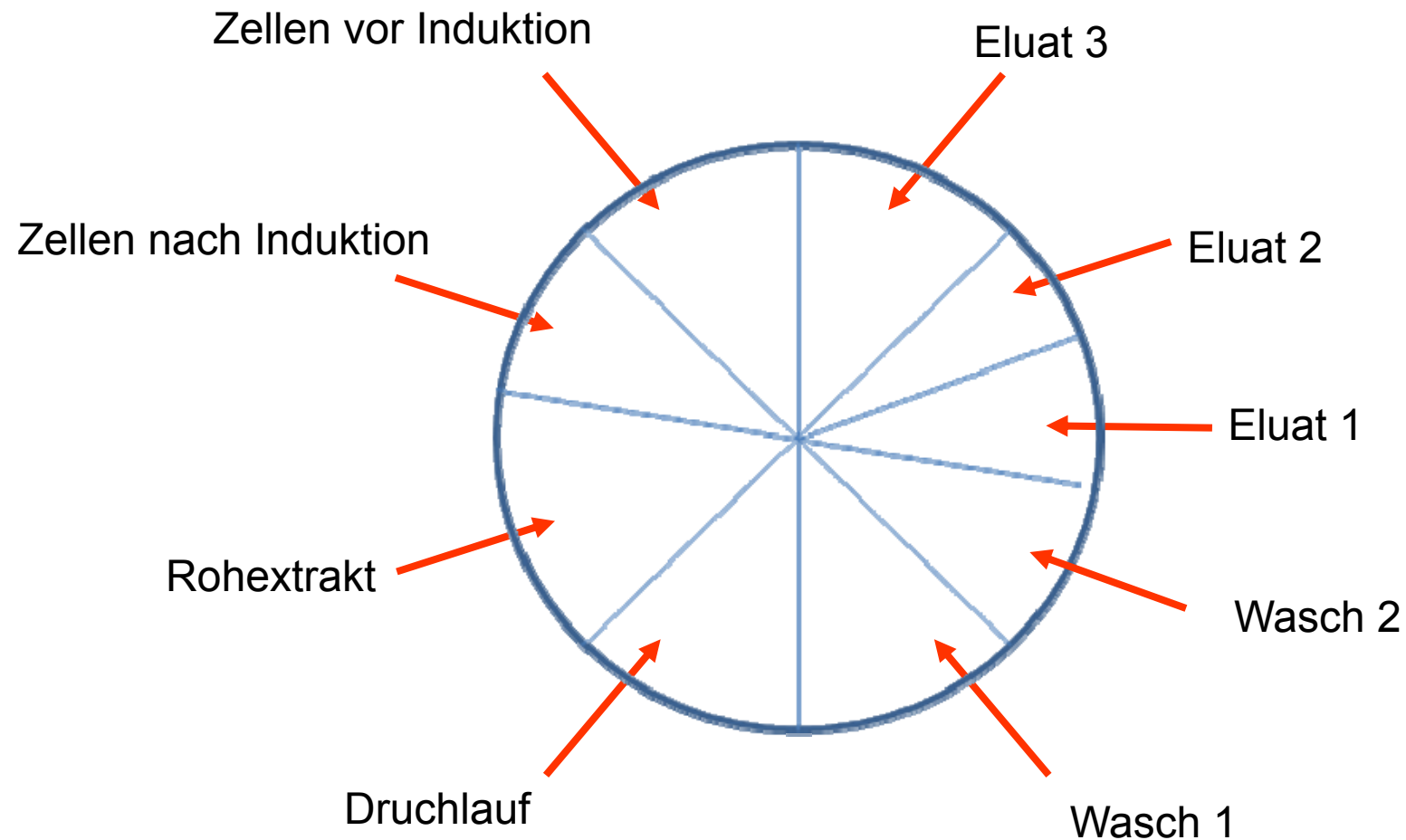
Bettina Siebers

Protein Expression



Aktivitätstest

- Platte in 9 Teile unterteilen
- 10 μ l der verschiedenen Proben auftragen



Aktivitätstest



IMAC

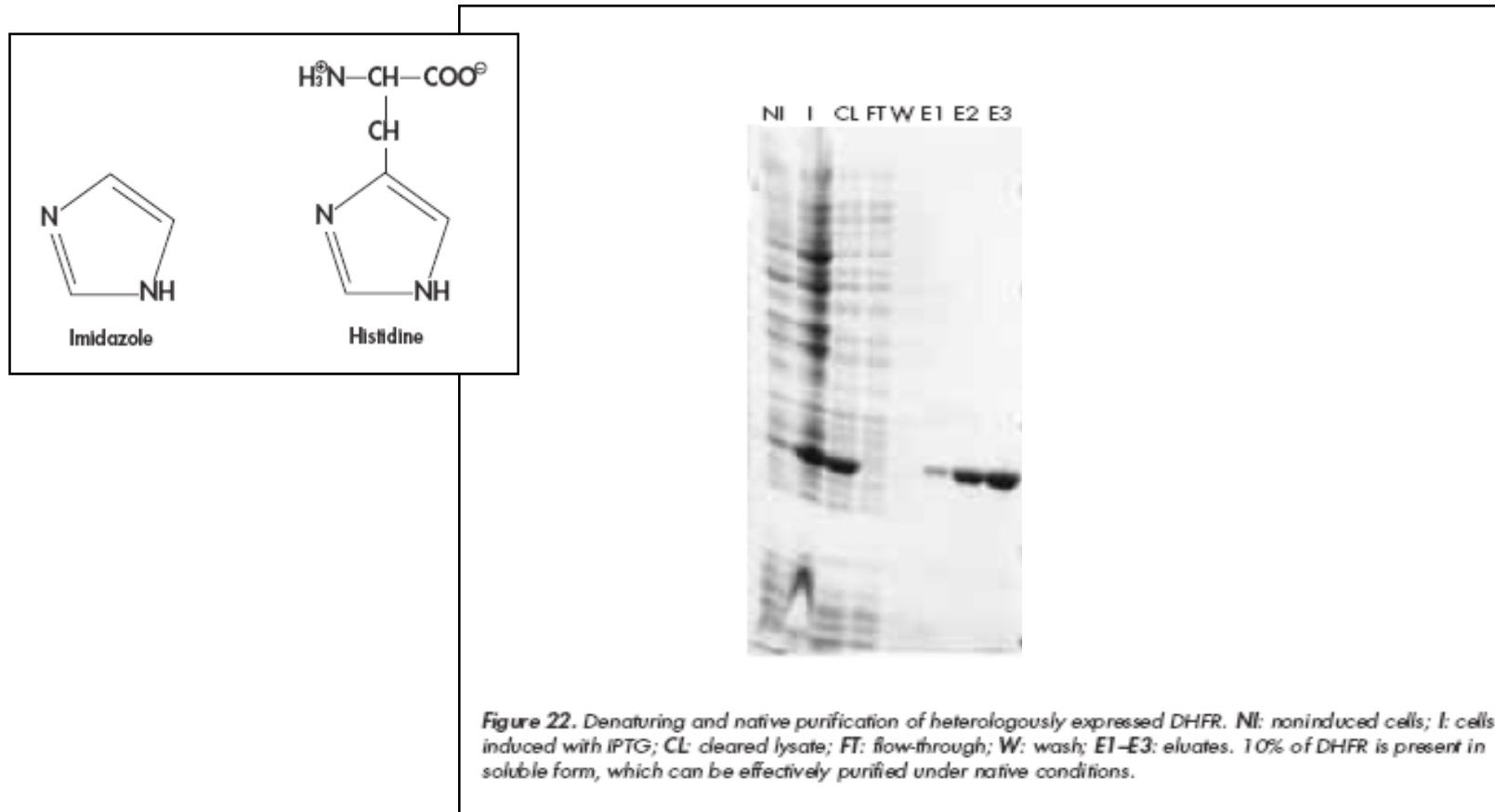
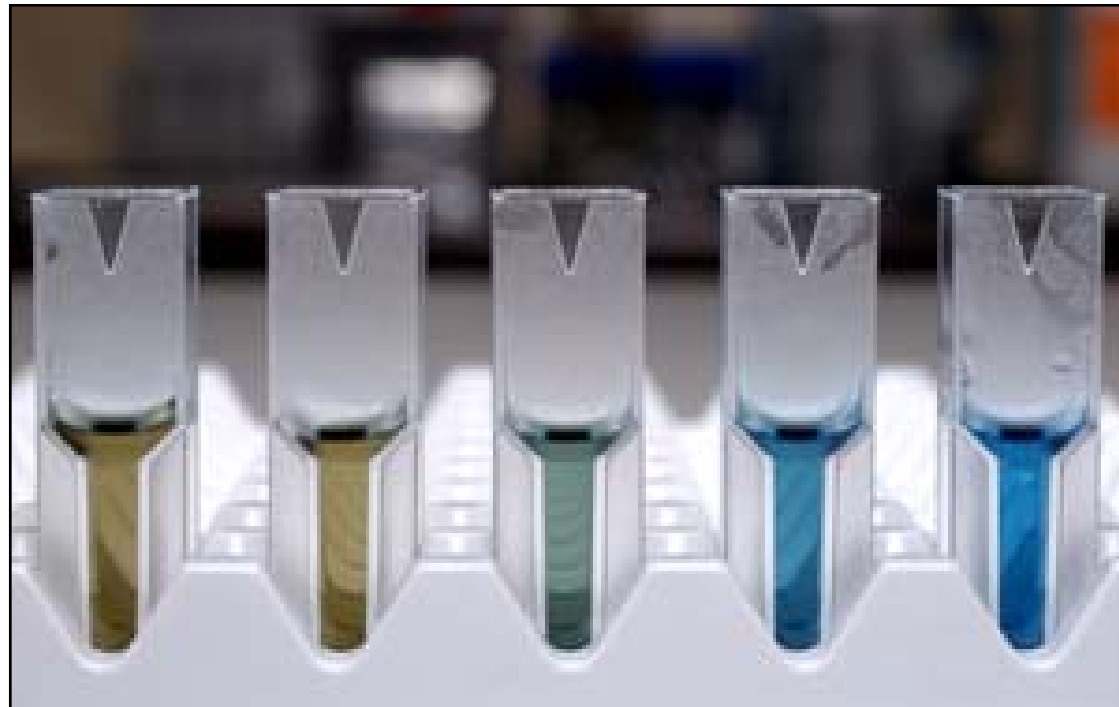


Figure 22. Denaturing and native purification of heterologously expressed DHFR. NI: noninduced cells; I: cells induced with IPTG; CL: cleared lysate; FT: flow-through; W: wash; E1-E3: eluates. 10% of DHFR is present in soluble form, which can be effectively purified under native conditions.

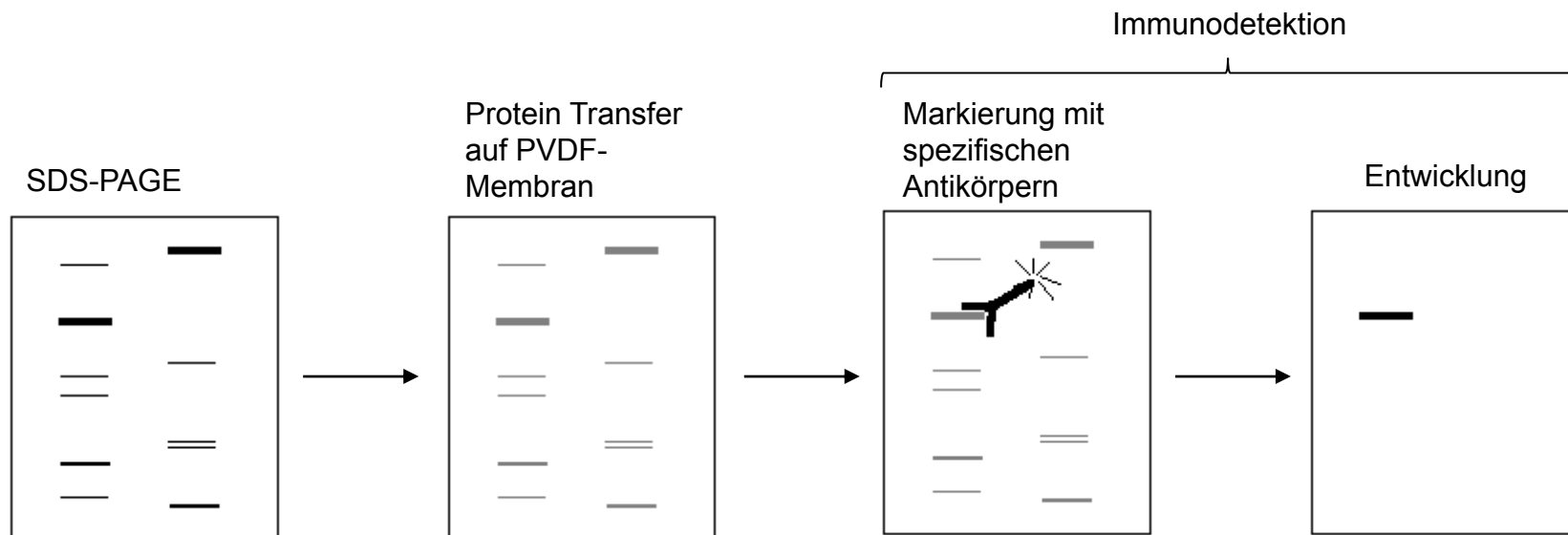
Proteinbestimmung



Westernblot

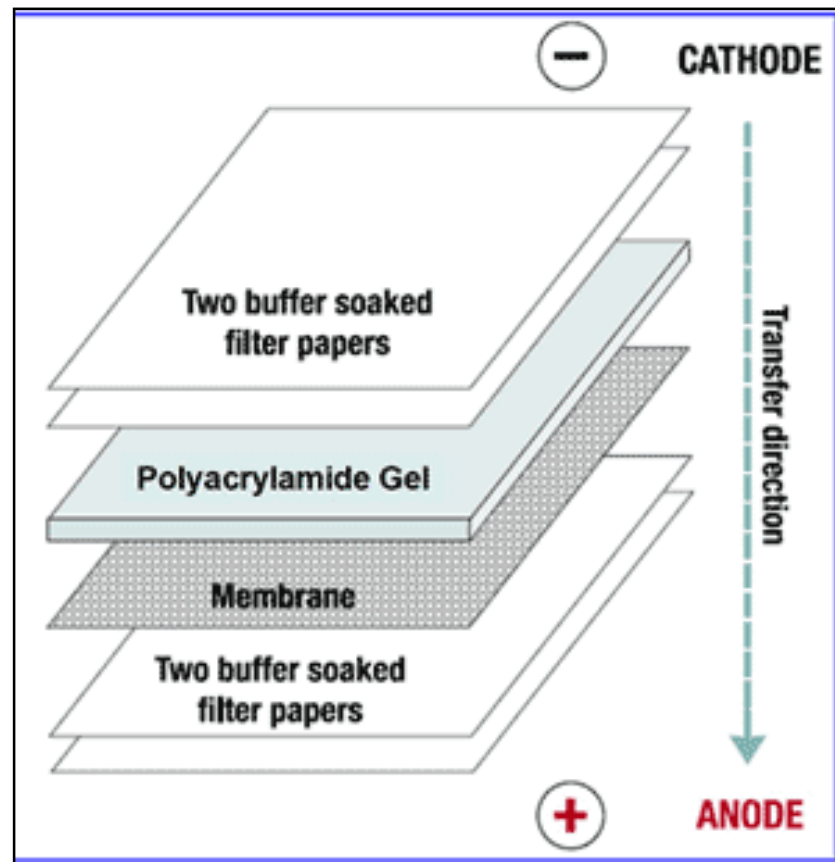
➤ = Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Träger-Membran (PVDF = Polyvinylidenfluorid; Nitrocellulose)

1. Elektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE)
2. Elektrophoretischer Transfer der Proteine vom Gel auf eine Membran
3. Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern

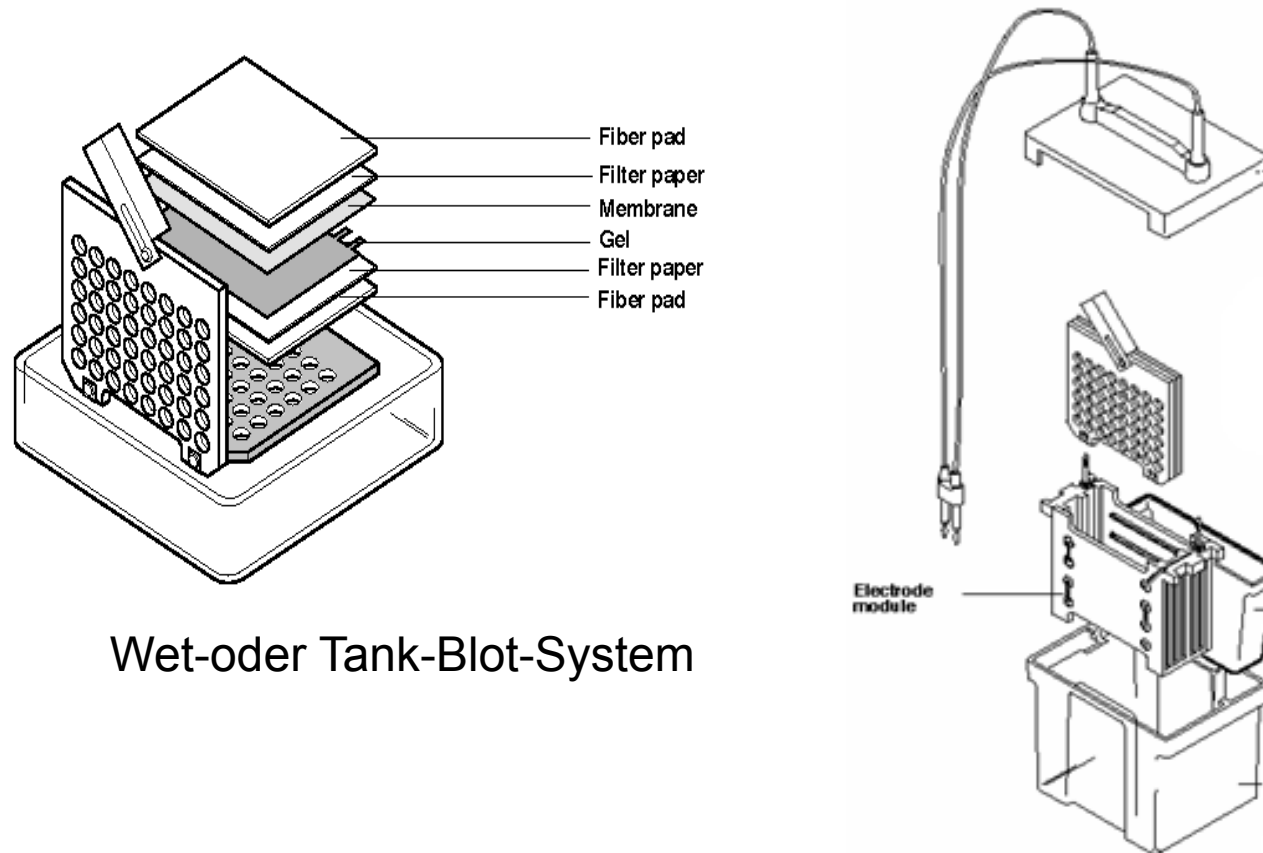


Westernblot

- Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Träger-Membran (PVDF = Polyvinylidenfluorid; Nitrocellulose)



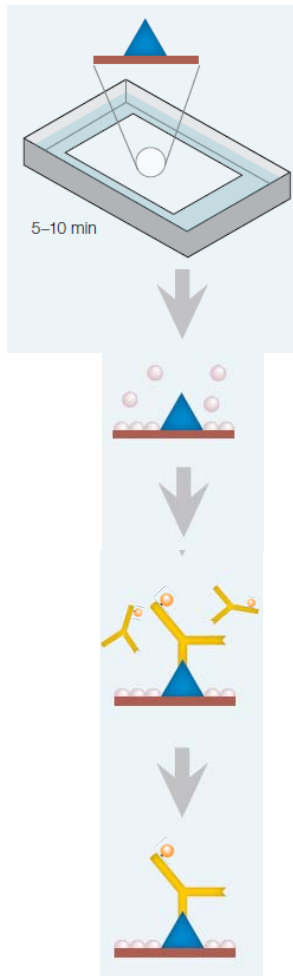
Westernblot



Wet-oder Tank-Blot-System

- SDS-Gel, Fiber pads und Filter Papier in Transferpuffer equilibrieren
- PVDF Membran zunächst in 100% Methanol aktivieren und dann in Transferpuffer equilibrieren

Immunodetektion

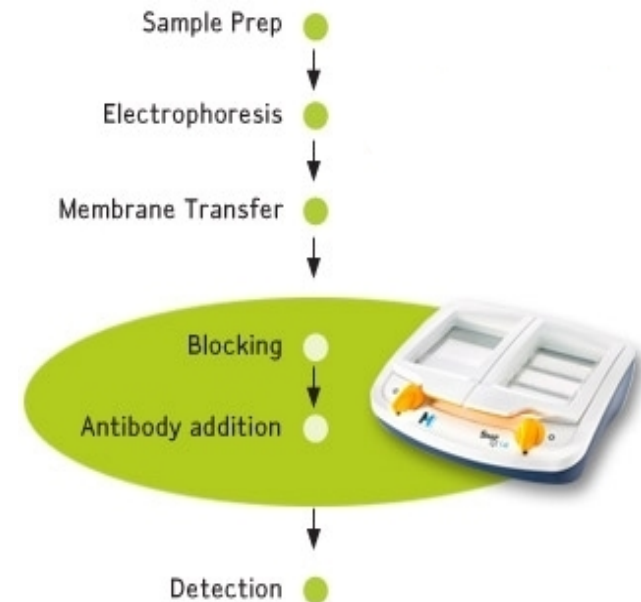


Waschen, 3 x mit je 30 ml TBST-Puffer (1x TBS + 0,3% Tween-20) unter laufendem Vakuum

Blocken der freien Bindestellen auf der Membran, mit 30 ml TBST + 0,5 % Milchpulver unter laufendem Vakuum

AP-konjugierter Primärantikörper **Anti-His-tag AK**, 1:1000 (3 µl in 3 ml TBST + 0,5 % Milchpulver 10 min **ohne Vakuum**

Waschen, 3 x mit je 30 ml TBST-Puffer (1x PBS + 0,3% Tween-20) und 2 x mit 30 ml TBS unter laufendem Vakuum

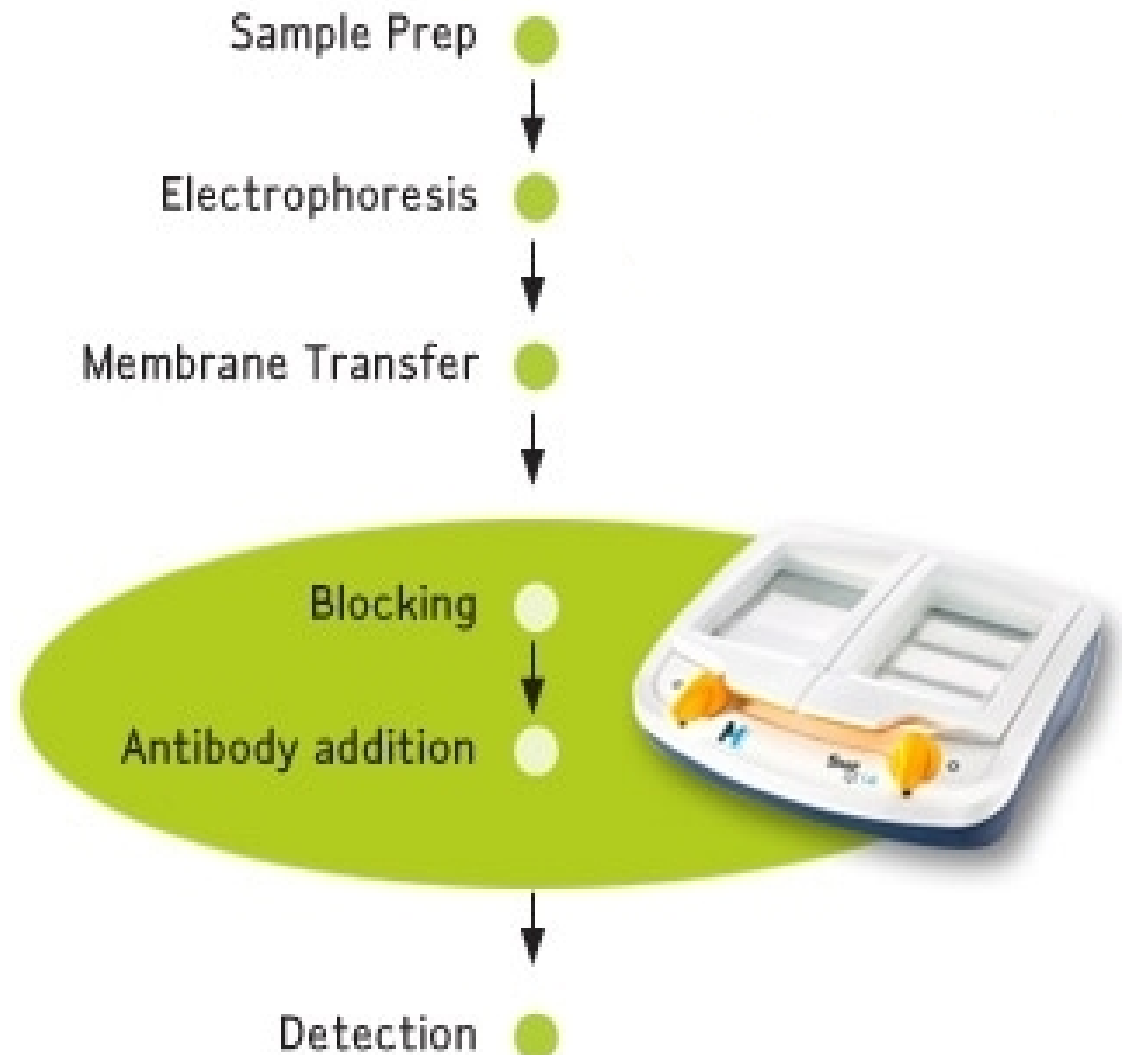


SNAP i.d. Western Blot System

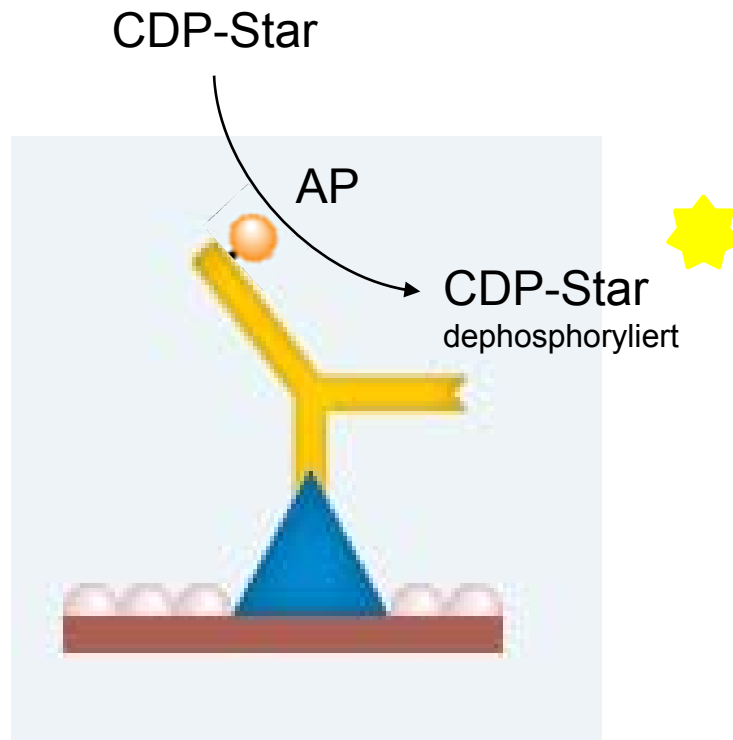
- SNAP i.d.™ Western Blot-System ermöglicht den Proteinnachweis auf der Blottingmembran innerhalb von 30-60 Minuten.
- Mittels Vakuum werden alle verwendeten Lösungen durch die Membran gesaugt.

Vorteile:

- Blots mit niedrigem Hintergrund
- Zeitersparnis von mindestens 4 Stunden

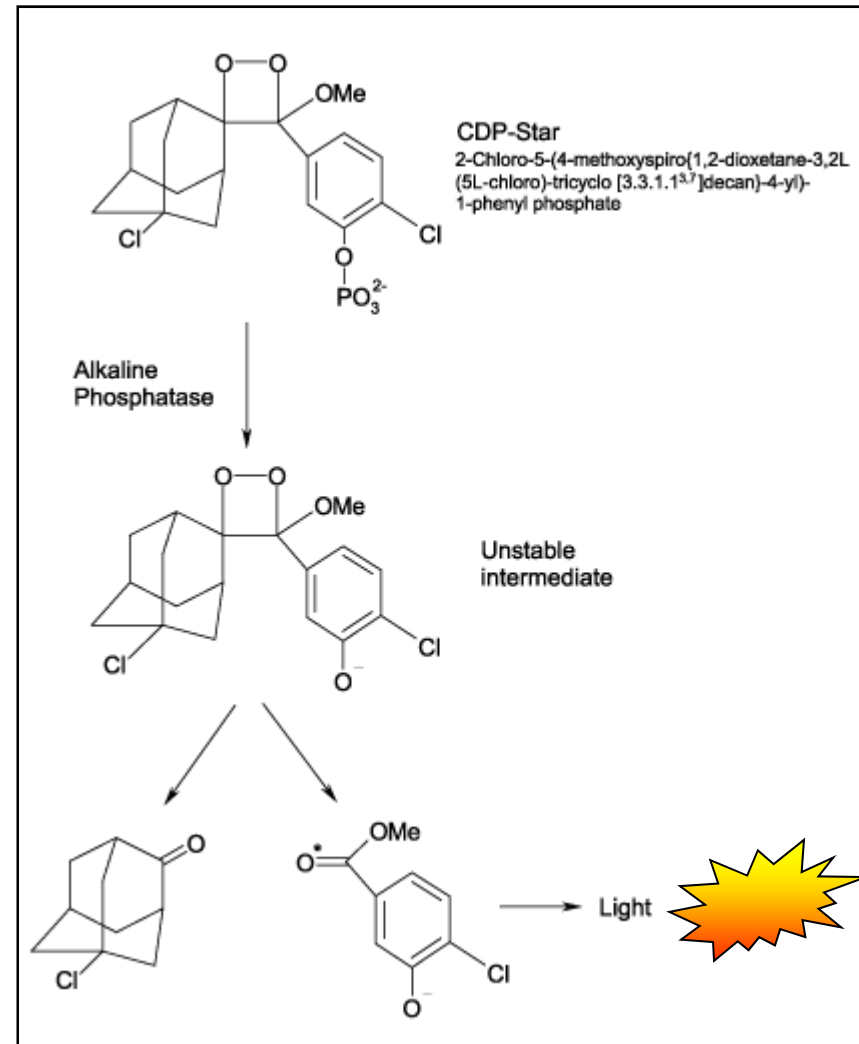
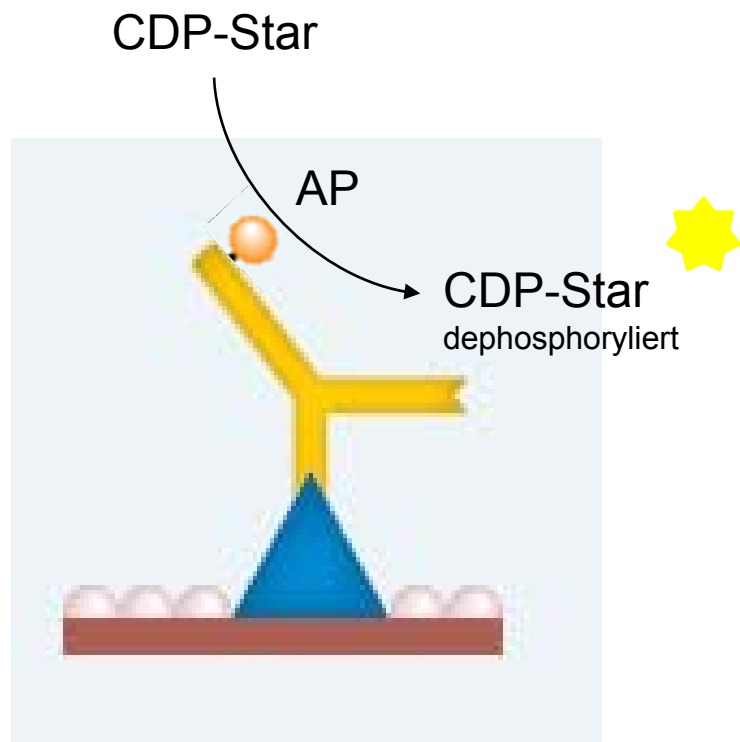


Immunodetektion



- Primärer Antikörper:
Anti-His-Tag AK
(rabbit (Firma Abcam))
- **Alkalische Phosphatase**
(AP) konjugiert
- Substrat: CDP Star

Immunodetektion

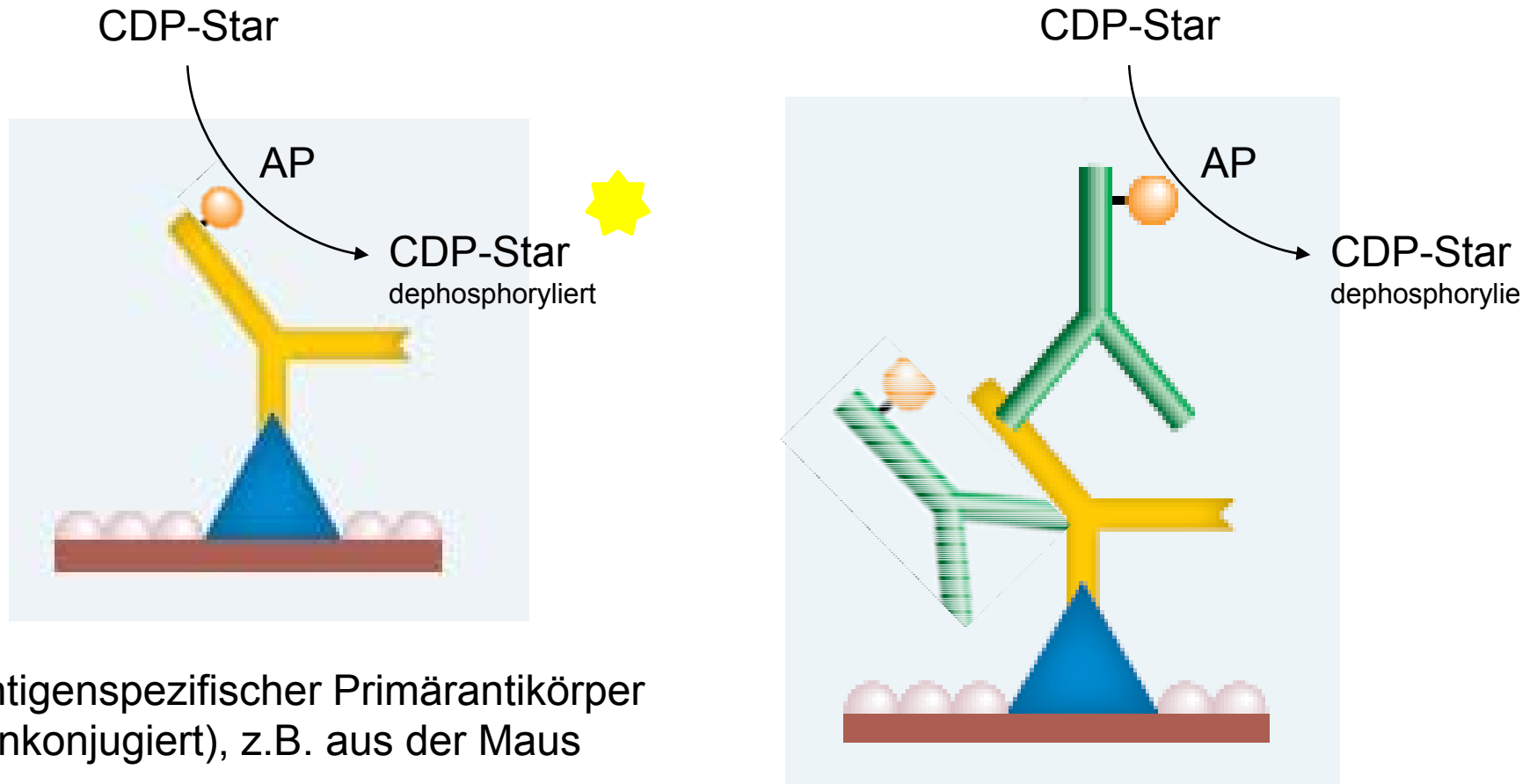


Immunodetektion

- **Entwickeln:** 2 x mit H₂O bidest. waschen
- Blot in eine Klarsichthülle legen (mit EtOH säubern) und mit ~ 1 ml CDP-Star überschichten (je nach Blotgröße!)
- Folie **blasenfrei!** schließen
- 5 min Inkubation
- **Detektion** der Chemilumineszens
VersaDoc (BioRad)



Immunodetektion



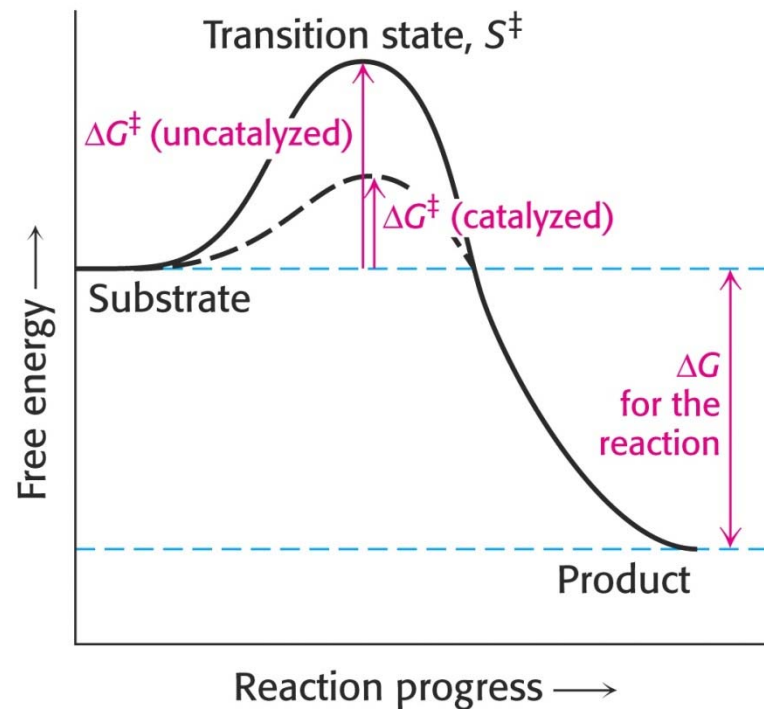
- antigenspezifischer Primärantikörper (unkonjugiert), z.B. aus der Maus
- Enzymkonjugierter Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper (z.B. aus der Ziege gegen Mausantikörper)

Praktikum Biochemie

„Einführung in die Molekularbiologie“

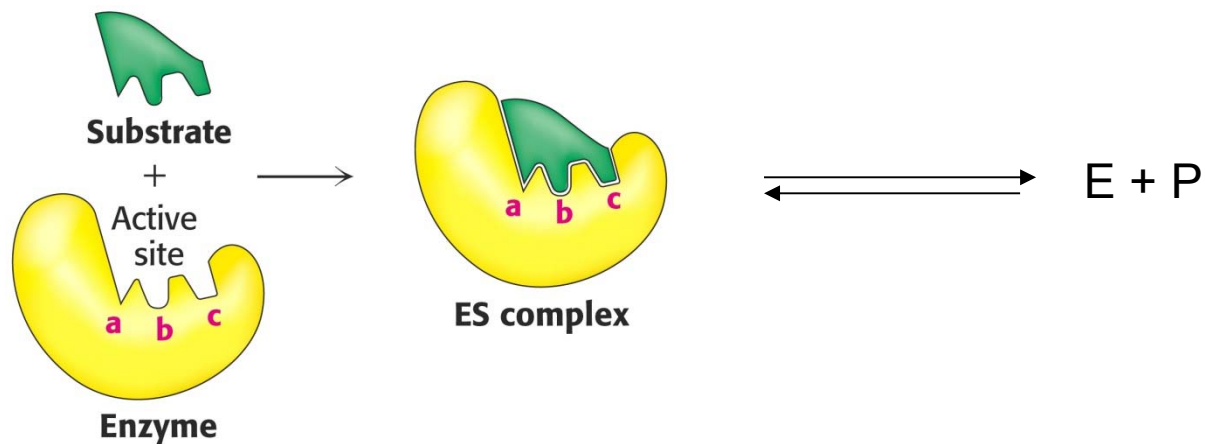
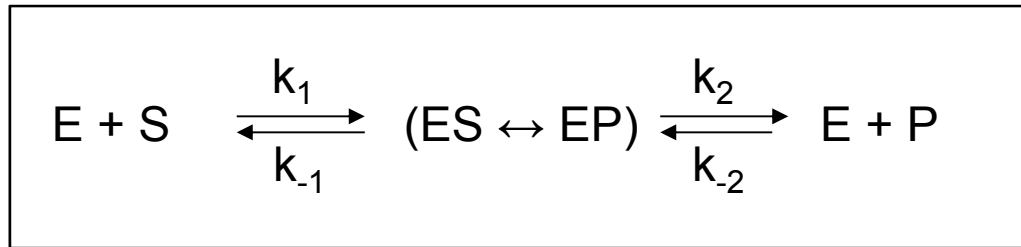
Bettina Siebers

Energieverlaufdiagramm



- Die Differenz zwischen freier Energie der Edukte und freier Energie des aktivierten Übergangszustands muss überwunden werden
- Enzyme (Katalysatoren) senken die Aktivierungsenergie, beschleunigen die Einstellung des Gleichgewichts, verändern aber dessen Lage nicht
- Enzyme verändern die Kinetik einer Reaktion nicht aber die Energetik

Enzymkinetik



- Enzyme katalysieren eine Reaktion, indem sie den Übergangszustand einer Reaktion begünstigen (die Aktivierungsenergie ΔG^* erniedrigen).
- Bei der Katalyse bilden Enzym und Substrat einen Enzym-Substrat-Komplex aus, der dann zum Produkt weiterreagieren kann

Enzymkinetik

- Untersuchung des Mechanismus einer Enzymreaktion
 - „*in vitro*“ mit gereinigten Enzymen
- Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit und wie diese durch Veränderung der Versuchsparameter beeinflusst wird

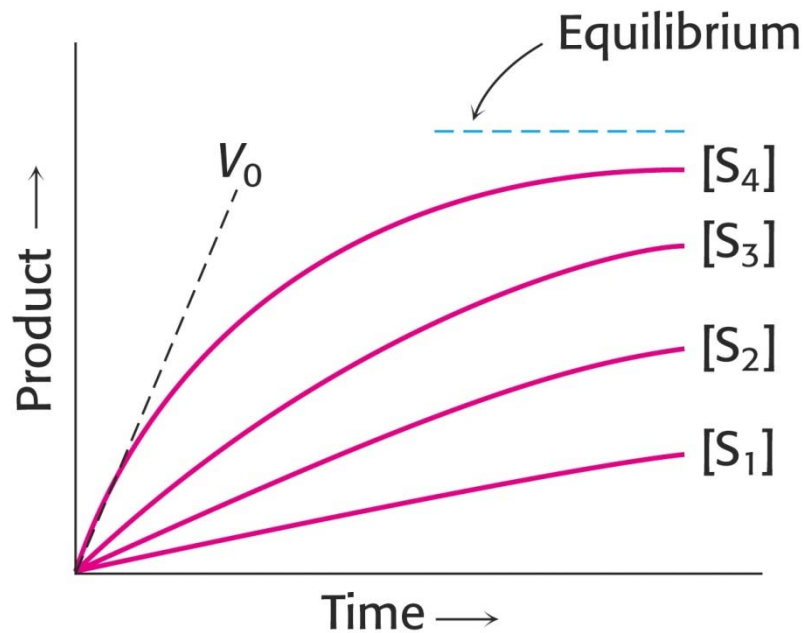
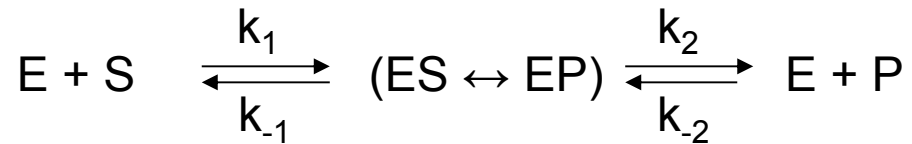


Leonor Michaelis
1875–1949



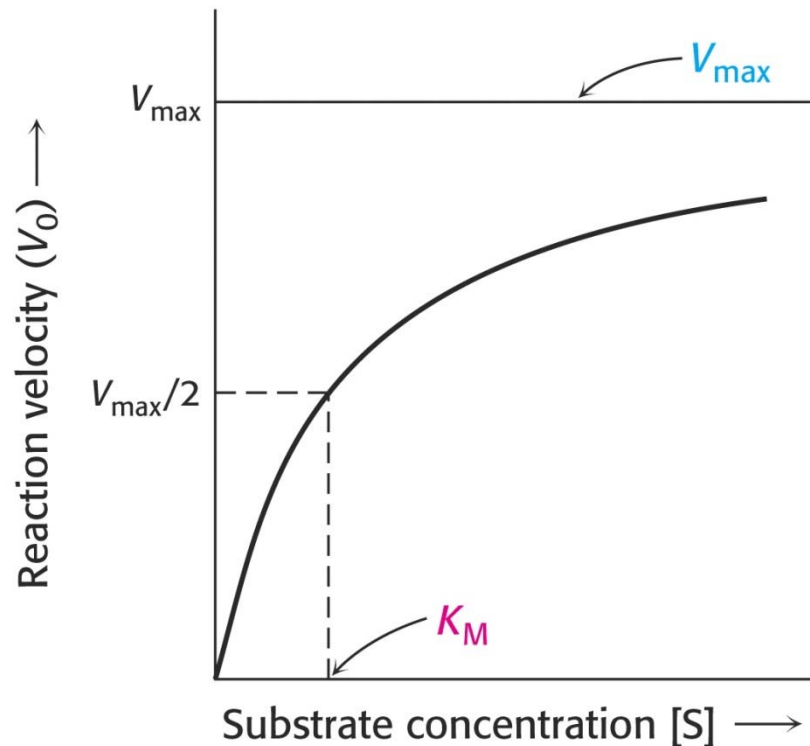
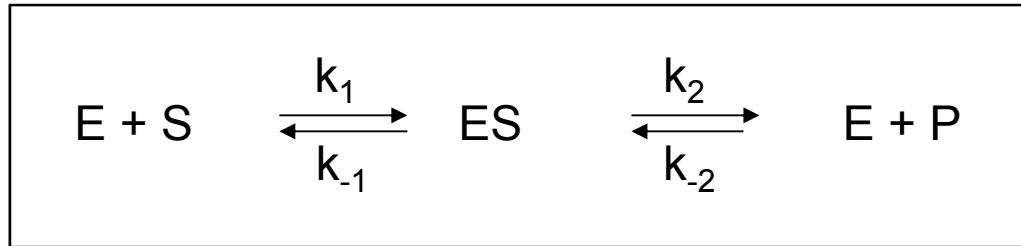
Maud Menten
1879–1960

Enzymkinetik



- $[S]$ beeinflusst die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion
- Problem: $[S]$ verändert sich während der Reaktion \rightarrow Umwandlung zu Produkt
- Ansatz: Messung der Anfangsgeschwindigkeit (V_0) wo $[S] \gg [P]$ ($\gg [E]$) und bei kurzen Messzeiten \rightarrow Änderung von $[S]$ vernachlässigbar, $[S]$ kann als Konstante betrachtet werden

Michaelis-Menten-Gleichung



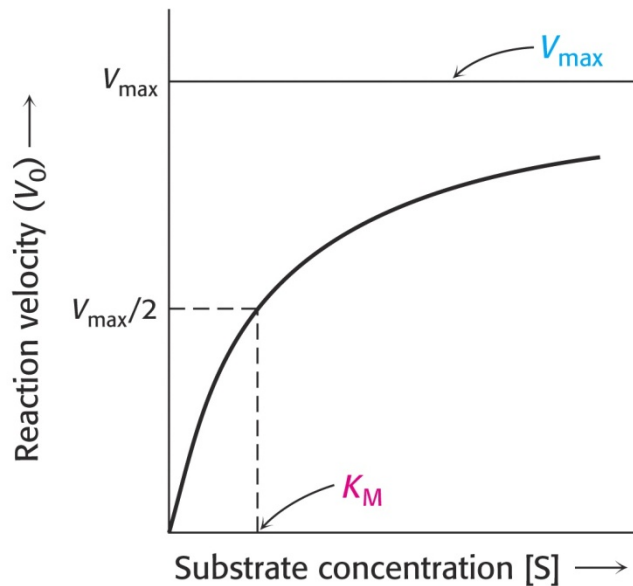
- Die MM-Kinetik formuliert einen Ausdruck, der die Katalysegeschwindigkeit mit den Substrat- und Enzymkonzentration verbindet.
- Das MM-Modell ist das einfachste, mit dem man die kinetischen Eigenschaften vieler enzymkatalysierter Reaktionen beschreiben kann

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit

K_M : Substratkonzentration bei der $\frac{1}{2} V_{\max}$ erreicht wird = Maß für die Affinität des Enzyms zu Substrat

Michaelis-Menten-Gleichung



$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

$$[S] \ll K_M: \quad V_0 = \frac{V_{\max}}{K_M} [S]$$

→ V₀ direkt proportional [S]

$$[S] \gg K_M: \quad V_0 = V_{\max} \quad (= k_2 [E_t])$$

→ V₀ durch Erhöhung von [S] nicht mehr steigerbar ([S]/[S]+K_M = 1)

$$[S] = K_M: \quad V_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$$

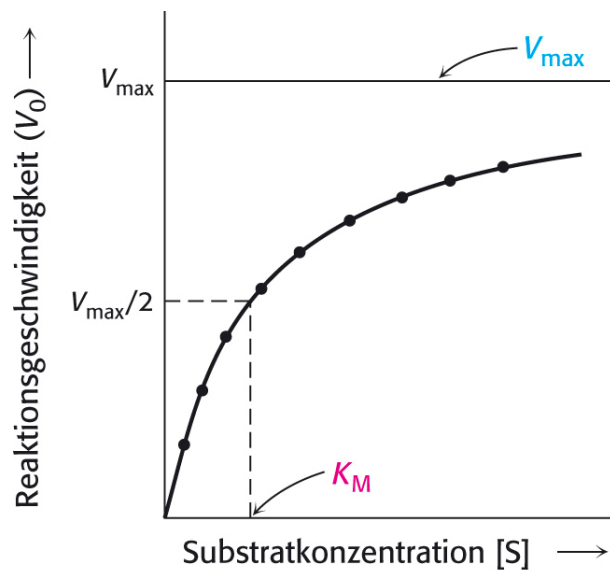
→ [S]/[S]+K_M = 1/2 ; K_M ist diejenige Substratkonzentration bei der die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit erreicht ist

Lineweaver-Burk-Blot

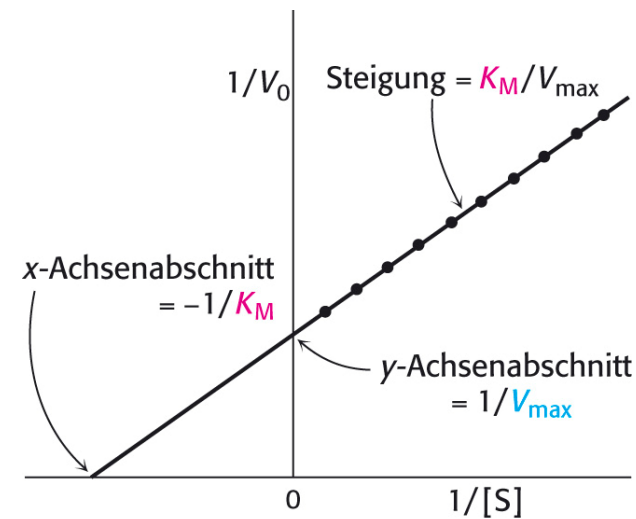
$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

→

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

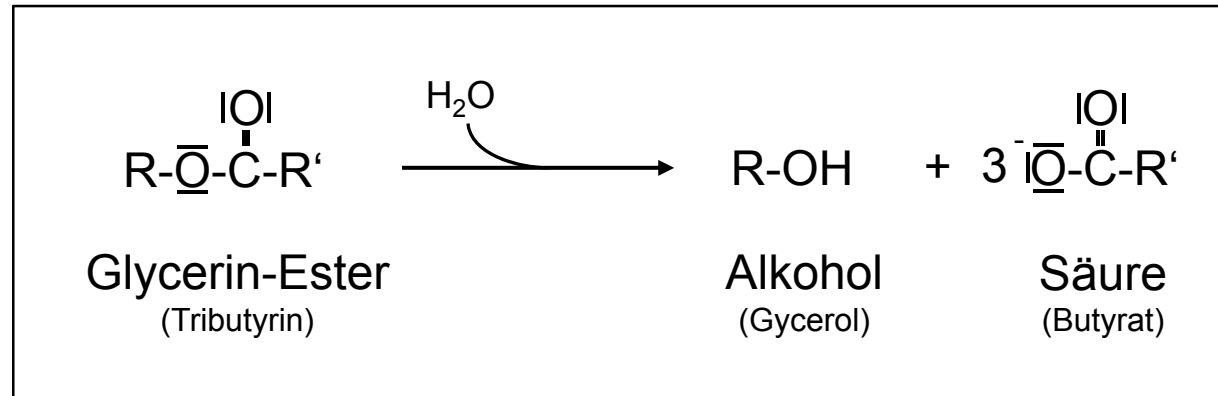


Aus: Berg/Tymoczko/Stryer, *Biochemie*, 6. Aufl., © 2007 Elsevier GmbH

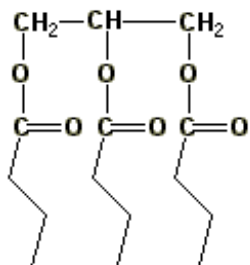


Aus: Berg/Tymoczko/Stryer, *Biochemie*, 6. Aufl., © 2007 Elsevier GmbH

Esterase

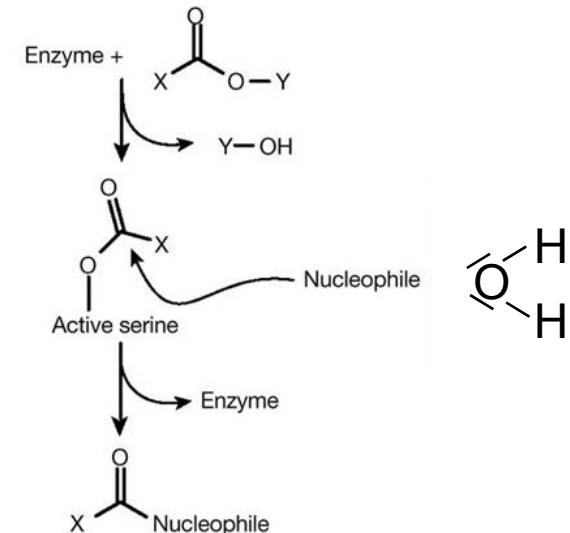


Tributyryn



Esterase (EC 3.1.1.1):

- Carboxylester-Hydrolasen, hydrolysieren Glycerinester von kurzkettigen Fettsäuren (C<10)
- Aufbau des aktiven Zentrums, Hydrolyse-Mechanismus weitgehend identisch mit Lipasen (Unterschied: Kinetik der Umsetzung hydrophober Substrate)



Enzymaktivität

Enzymaktivität: Units (U), 1 U = 1 μmol Substrat pro min (bzw. Produkt bildet)

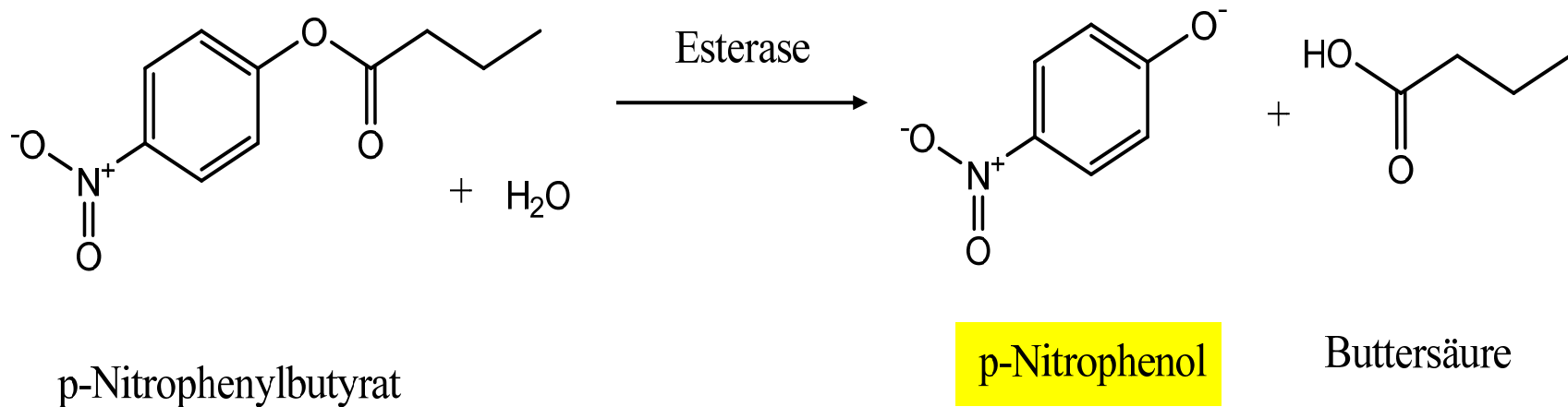
$$U = \frac{\mu\text{mole } S_{\text{verbraucht}} \text{ (Produkt}_{\text{gebildet}})}{\text{min}}$$

Spezifische Enzymaktivität = U pro mg Enzym (U/mg)

Wechselzahl k_{kat} = Anzahl der Substratmoleküle, die pro Enzymmolekül in einer Sekunde umgesetzt werden (sec^{-1})

(\rightarrow Stoffmengenumsatz pro Zeiteinheit)

Esterase - Enzymassay

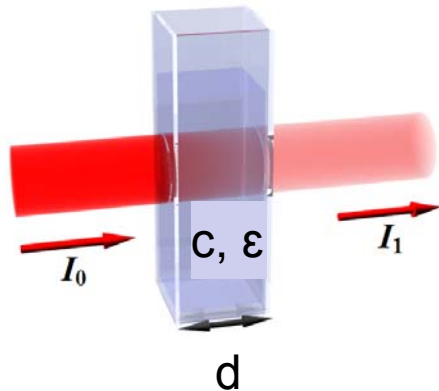


- 100 mM Kaliumphosphat-Puffer
1 mM pNP-Butyrat (-Laurat)
10 µg gereinigtes Enzym
(1 ml Endvolumen)
- 10 min Inkubation
- E_{410} gegen Referenz

$$\lambda = 410 \text{ nm}$$
$$\epsilon = 1.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Lambert-Beersches Gesetz

Schwächung der Strahlungsintensität in Abhängigkeit von der Weglänge und der Konzentration beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz

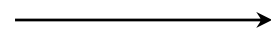


$$I_1 = I_0 e^{-\epsilon'cd}$$

$$\rightarrow I_1/I_0 = e^{-\epsilon'cd}$$

$$\rightarrow \lg(I_0/I_1) = \epsilon * c * d = E$$

$$E = \epsilon * c * d$$



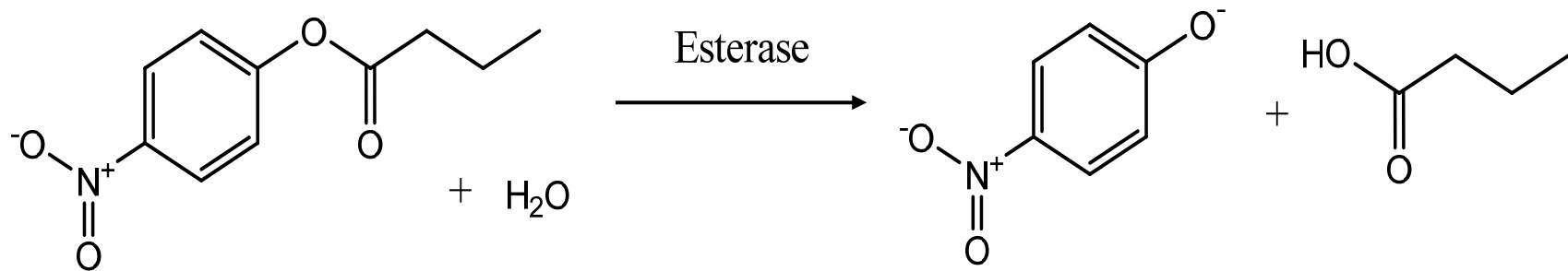
$$c = E / (\epsilon * d)$$

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke (1 cm)

Esterase - Enzymassay

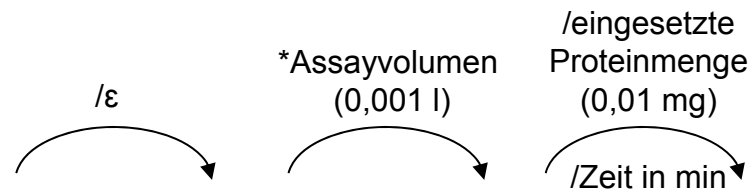


p-Nitrophenylbutyrat

p-Nitrophenol

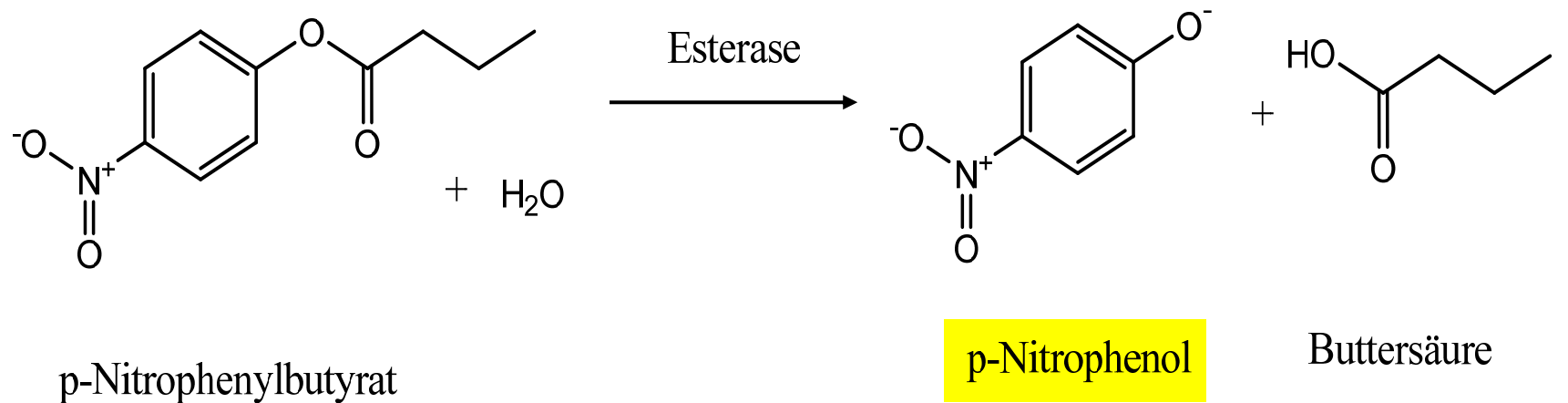
Buttersäure

$\lambda = 410 \text{ nm}$
 $\epsilon = 1.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$



Substrat	Temp. [°C]	ΔE_{410}	Konzentration pNP [μM]=[$\mu\text{mole}/\text{l}$]	Stoffmenge pNP [μmol]	Spez. Aktivität [U/mg]
pNP-	RT	0,12	100,0	0,10	1,0

Esterase - Enzymassay



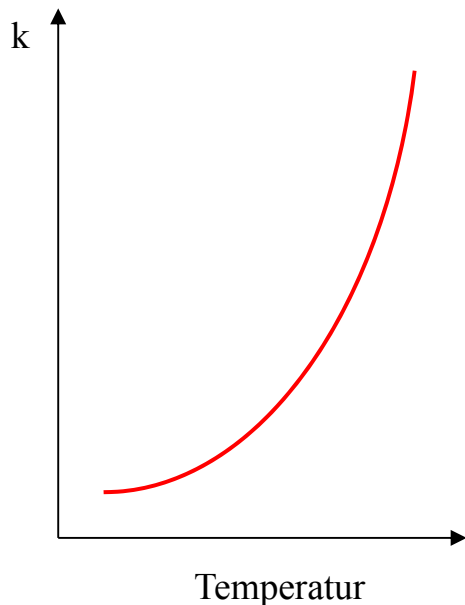
$$\lambda = 410 \text{ nm}$$
$$\epsilon = 1.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

- Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur mit pNP-Butyrat und pNP-Laurat
- Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Inkl. jeweils der graphischen Darstellung

Reaktionsgeschwindigkeit und Temperatur

- Die Geschwindigkeit einer Reaktion ist neben der Konzentration der Reaktanten ($\Rightarrow \text{RG} = k [\text{A}][\text{B}]$) abhängig von und der Temperatur



Arrhenius-Gleichung:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

- Reaktionsgeschwindigkeit steigt exponentiell mit der Temperatur an, umso schneller je kleiner die Aktivierungsenergie (E_a)
- je kleiner die Aktivierungsenergie desto höher die Reaktionsgeschwindigkeit

Temperaturoptimum

