

Einführung

1. Einleitung

Die vorliegende Anleitung für das biochemische Praktikum an der Medizinischen Fakultät versucht, den Studenten mit einem breiten Spektrum biochemischer Methoden von unterschiedlichem Schwierigkeitsgrad vertraut zu machen. Eine Beschreibung der theoretischen Grundlagen ergänzt die ausführlich beschriebenen Versuche.

Jeder Versuch muss vom Studenten theoretisch gründlich vorbereitet und die Methodik vor Beginn genau durchdacht werden. Anders ist ein erfolgreiches Experimentieren nicht denkbar. Eine Zusammenstellung der Wissensgebiete ist jedem Versuch vorangestellt. Sie werden in der Vorlesung in Anlehnung an die Approbationsordnung ausführlich dargestellt. Diese Gebiete sollten die Studenten beherrschen.

Jeder Versuch mit allen Experimenten muss an einem Praktikumstag beendet werden. Die verfügbare Zeit sollte daher zweckmäßig eingeteilt werden. Versuche mit langer Dauer sollten als erste begonnen werden; Wartezeiten bei länger laufenden Versuchen können für kürzere Experimente genutzt werden. Die Praktikumszeit ist einzuhalten. Bei zügiger Durchführung verbleibt in allen Versuchen Zeit zur sorgfältigen Auswertung der Ergebnisse und Besprechung der theoretischen Grundlagen.

Ein Versuch gilt als abgeschlossen, wenn die experimentellen Ergebnisse vom Assistenten überprüft und testiert, der Arbeitsplatz und die benutzten Geräte aufgeräumt und zur Reinigung vorbereitet sind.

Über alle Versuche ist Protokoll zu führen. Das Protokoll muss enthalten:

1. Datum und Bezeichnung des Versuchs.
2. Fragestellung, evtl. Reaktionsgleichungen
3. In knappem Stil, aber lückenlos, die experimentellen Ergebnisse (Meßzahlen, Chromatogramme, Beobachtungen) und die Auswertung dieser Ergebnisse (Diagramme, Berechnungen). Es sollten alle zum Nachvollziehen des Versuchs notwendigen Angaben, insbesondere Konzentrations- und Mengenangaben gemacht werden.
4. Abschätzung der Fehler mit anschließender Diskussion, inklusive Vergleich mit in der Klinik auftretenden Werten.

Es wird besonderer Wert auf eine übersichtliche und saubere Anordnung der Werte im Protokoll gelegt. Chromatogramme, Diagramme sollen eingheftet oder eingeklebt werden, "fliegende Blätter" werden nicht akzeptiert. Die Protokolle sind am gleichen Tag bis 19.00 Uhr fertig zu stellen.

Die regelmäßige, erfolgreiche Teilnahme am biochemischen Praktikum wird ferner nach einem zufriedenstellend gehaltenen Referat (s. u.) bescheinigt.

Unvorbereitete Studenten müssen über eine Hausarbeit bei Prof. Höning referieren.

Referate

Neben den acht experimentellen Versuchsnachmittagen werden zusätzlich an drei Tagen Seminare abgehalten, in denen die Studenten jeweils vier Referate über zum Praktikumsabschnitt passende Themen halten. Die nicht mehr im Praktikum enthaltenen Versuchsthemen "Puffer", "Bioenergetik" und "Kohlenhydrate" sind auch Bestandteile dieser Seminare.

Die Referatthemen werden nach der Vorbesprechung zum Praktikum vergeben. Jedes Referat dauert 20 Minuten und wird von zwei Studenten gehalten, die beide ihren Teil eigenständig vortragen. Anschließend wird 10 Minuten diskutiert und die Leistung der Vortragenden bewertet. Jeder Student hat im Verlauf des Blockunterrichts ein Referat zu halten. Ohne Referat wird der Schein zur erfolgreichen Teilnahme am Biochemischen Praktikum nicht ausgestellt.

2. Hinweise zur Unfallverhütung

Im Labor ist das Tragen eines **Baumwollkittels** und einer **Schutzbrille** Pflicht!



Abbildung 1: Alle gefährlichen Chemikalien werden unter dem Abzug gelagert. Die Handhabung erfolgt ebenfalls unter dem Abzug.

Lösungen werden in der benötigten Menge aus der Vorratsflasche in ein Reagenzglas oder in ein Becherglas gegossen; aus der Vorratsflasche sollen Lösungen nie mit einer Pipette entnommen werden. Feste Substanzen werden mit sauberem Spatel entnommen. Man arbeite grundsätzlich mit möglichst kleinen Substanzmengen. Beim Arbeiten mit Eppendorfreaktionsgefäßen achten Sie bitte darauf, dass sich die Lösung am Boden des Gefäßes befindet (Gegebenenfalls kurz abzentrifugieren!).



Abbildung 2: Bei einem Unfall mit Chemikalien geeignete Maßnahmen einleiten. Über jeder Tür befindet sich eine Notdusche. Zur Sicherheit werden Gasflaschen in einem Stahlschrank aufbewahrt. Auf den Tischen ist die Verwendung offener Flamme nicht erlaubt, sondern nur unter besonders gekennzeichnetem Abzug.

Die erforderlichen Geräte müssen sorgsam benutzt werden. Zentrifugen bitte nur betreiben, wenn sie vorher austariert worden sind. Die Glasgeräte sind nach dem Praktikum zu entleeren und kurz mit Wasser vorzureinigen; die Sauberkeit der Geräte ist Vorbedingung für zuverlässige Ergebnisse.

Pipettieren:

Die am Arbeitsplatz bereitliegenden automatischen Pipetten, Schliffpipetten, Pipettierhilfen oder Spritzen sollen zur Dosierung entsprechender Lösungen benutzt werden. Es darf auf keinen Fall mit dem Mund pipettiert werden! Konzentrierte Säuren wie z.B. HNO_3 , H_2SO_4 , CH_3COOH , HCl oder Laugen wie z.B. NaOH , KOH , NH_4OH sowie giftige (Cyanid-Lösungen, DIFP) oder infektiöse Lösungen wie Serum, E. coli-Suspensionen können ein erhebliches Gefahrenpotenzial darstellen. Daher stehen automatische Pipetten s. u. und Pipettierhilfen zur Verfügung: Blaue Pipettierhilfen für 1 ml Glaspipetten, rote Pipettierhilfen für 5, 10 oder 20ml Glaspipetten. Die Pipetten werden vorsichtig in den Gummiadaptor gesteckt und die Flüssigkeit wird mit Hilfe des Rändelrads aufgezogen. Zum Ablassen der Flüssigkeit wird der seitlich angebrachte Schalter gedrückt. Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass Flüssigkeit in die Pipettierhilfe gelangt. Tipp: Ziehen Sie zuerst einen Überschuss an Flüssigkeit auf, und stellen Sie dann das genaue Volumen mit Hilfe des Ablassschalters ein.

Jeder Student ist angehalten, in eigener Verantwortung mit den Chemikalien umsichtig und fachgerecht so umzugehen, dass selbst verhältnismäßig ungefährliche Lösungen nicht auf den Körper oder in den Mund gelangen können. Essen, Trinken und Rauchen sind strikt untersagt. Der Umgang mit Chemikalien ist nicht narrensicher und verlangt Vorsicht, Verantwortungsbewusstsein und entsprechende Sachkenntnisse.



Abbildung 3: Im Falle eines Feuers müssen möglichst alle Praktikanten zügig den Praktikumssaal verlassen. Über die Verwendung der bereitgestellten Löschgeräten unterrichtet die Feuerwehr. Einmal im Semester werden Übungen veranstaltet.

3. Bedienungsanleitung für Geräte , die in mehreren Versuchen genutzt werden

Precision blau 100 - 1000 μ l

Um auch im Mikroliter-Bereich genau und sicher pipettieren zu können, stehen Ihnen mechanische Pipettierhilfen der Firmen Biozym (PreCision) oder Gilson (PIPETMAN) zur Verfügung. Je nach Modell können Sie damit zwischen 2 und 5000 μ l pipettieren. Das unsachgemäße Arbeiten mit diesen Präzisionsgeräten führt zur Zerstörung der Pipettierhilfen, die hohe Kosten verursachen. Beachten Sie bitte diese Arbeitshinweise und **üben Sie** vor dem ersten Einsatz der Pipetten den Gebrauch mit entionisiertem Wasser.

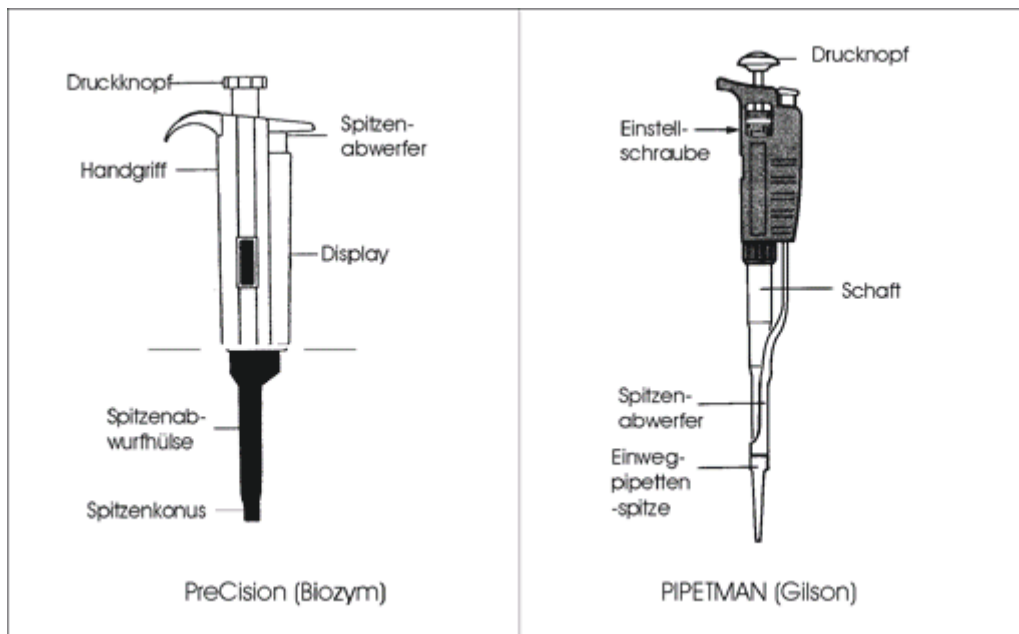


Abbildung 4: Automatische Pipettierhilfen

Die Pipetten haben ein digitales Mikrometer, das das Volumen angibt. Das Volumen wird durch Drehen einer Einstellschraube (bei der PreCision identisch mit dem Druckknopf, bei PIPETMAN, schwarze geriffelte Schraube) eingestellt. Dabei dürfen die Einstellbereiche der einzelnen Pipetten **auf keinen Fall** über- oder unterschritten werden:

Pipetman P20	2 - 20 μ l
Pipetman P100	20 - 100 μ l
Pipetman P200	50 - 200 μ l
Pipetman P1000	200 - 1000 μ l
Pipetman P5000	1000 - 5000 μ l
Precision rot	5 - 50 μ l
Precision blau	100 - 1000 μ l

Die Digitalanzeigen der PreCision Pipetten werden von links nach rechts abgelesen und zeigen den tatsächlichen Wert in μ l an. Bei der Precision rot sind 0,5 μ l Schritte einstellbar. Die Digitalanzeige der Pipetman-Pipetten werden von oben nach unten abgelesen und bestehen aus 3 Ziffern. Bei P20, P100 und P200 bedeuten die schwarzen Ziffern Mikroliter und die roten Ziffern zehntel Mikroliter, bei P1000 und P5000 bedeuten die roten Ziffern Milliliter und die schwarzen Ziffern Mikroliter.

Für Pipetman P20, P100, P200 und Precision rot werden gelbe, für Pipetman 1000 und Precision blau werden blaue und für Pipetman P5000 werden transparente Einwegpipettenspitzen aus Polypropylen verwendet. Die passenden Spitzen werden auf den Schaft der Pipette aufgesteckt und mit leichtem

Drehen so fest angedrückt, dass eine absolute Dichtheit gewährleistet ist. Dabei fassen Sie die Spitzen immer nur am oberen Ende an, niemals an der Spitze.

ACHTUNG: NIEMALS FLÜSSIGKEITEN OHNE SPITZE AUFNEHMEN!

Füllen

Den Druckknopf bis zum ersten Druckpunkt eindrücken (Abb. 5A). Die Pipette senkrecht halten, und die Spitze in die Probenflüssigkeit eintauchen. Den Druckknopf dann langsam und gleichmäßig zurückgleiten lassen (Abb. 5B) Eine Sekunde warten, und dann die Spitze aus der Flüssigkeit nehmen.

Entleeren

Das Ende der Spitze in einem Winkel von 10 - 40 Grad gegen die Innenwand des Gefäßes halten. Den Druckknopf langsam bis zum ersten Druckpunkt herunterdrücken (Abb. 5C). Eine Sekunde warten. Den Druckknopf bis zum zweiten Druckpunkt herunterdrücken, um restliche Flüssigkeit auszu stoßen. (Abb. 5D) Die Pipette mit ganz gedrücktem Druckknopf herausnehmen. Den Druckknopf loslassen (Abb. 5E)

Die Spitze durch Drücken des Spitzenabwerfers (P5000 nur manuell) abwerfen. Die Spitze muss nur gewechselt werden, wenn eine andere Flüssigkeit pipettiert oder die Volumeneinstellung geändert wird.

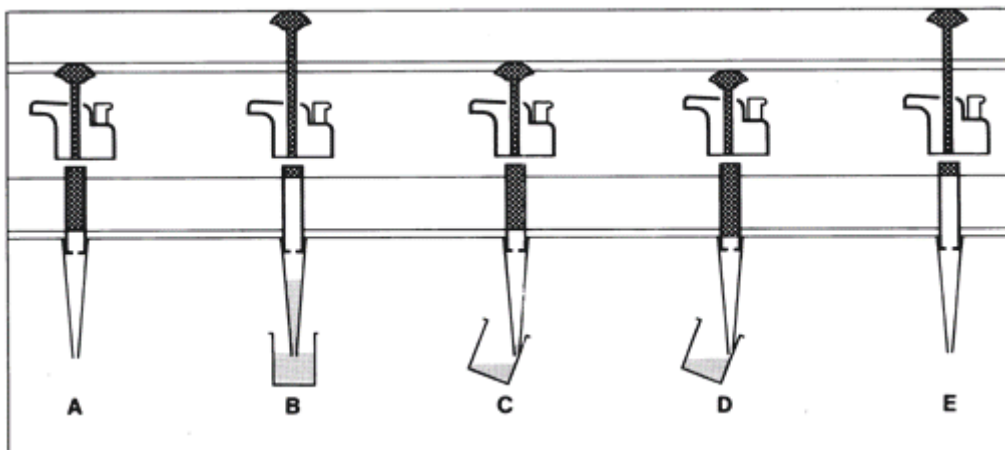


Abbildung 5: A-E Entleerung der Pipette

Gebrauch der pH-Meter

Die pH-Meter müssen vor Arbeitsbeginn geeicht werden (Versuch 1). Dazu stehen zwei Eichlösungen mit pH 7 und pH 4 zur Verfügung. Zuerst wird die Glaselektrode mit dest. Wasser gespült, dann (zerstörungsfrei) in die pH7 -Lösung eingetaucht und der pH-Wert ggf. mit dem Assymetriedrehknopf auf 7 einstellt. Dann wird die Elektrode mit Wasser gespült und in die pH4-Lösung eingetaucht. Erreicht der abgelesene Wert 3,9 -4,1, ist die Genauigkeit ausreichend für die in diesem Praktikum durchgeführten Versuche. Nur wenn der pH-Wert darunter oder darüber liegt, muss die Steilheit (2. Drehknopf) entsprechend erniedrigt oder erhöht werden. Nach dem Anpassen der Steilheit wird die Eichung wie oben beschrieben erneut durchgeführt, zuerst bei pH 7 dann bei pH 4.