

## Versuch 2: Aminosäuren und Proteine II

Bitte einen eigenen Laptop für die Auswertung mitbringen, da im Computerraum nur eine begrenzte Anzahl an Computern vorhanden ist.

### Versuche:

1. **Anionenaustauscherchromatographie\***
2. **Proteolytischer Verdau\***
3. **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**
4. **Western-Blot**

### Analysen:

1. **Molekulargewichtsbestimmung verschiedener Proteine**

### Wissensgebiete

Funktion von Proteinen:

- Enzyme
- Transportmoleküle
- Strukturelemente
- Antikörper
- Hormone

Proteasen: ihre Bildung, Vorkommen, pH-Optimum

Spezifität: Warum spaltet Pepsin nicht bei pH 7?

Lipoproteine:

- Klassifizierung und Komponenten
- Trennmethoden
- Pathobiochemie

Beispiele von Proteinen mit Kofaktoren (prosthetischen Gruppen)

Proteinbiosynthese

- Sequenzhomologie, Paralogie
- Posttranslationale Modifikationen: Glykosylierung und Hydroxylierung
- Adressierung und Kompartimentierung
- Zellulärer Proteinabbau

Peptide und Proteine: Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur

Bindungsarten in Proteinen:

- Kovalent - Peptidbindung, Disulfidbrücken
- Ionisch - zwischen Carboxyl- und Amoniumgruppen
- Van der Waals - Hydrophobe Wechselwirkung
- Dipol-Dipol-Wechselwirkung – Wasserstoffbrückenbindung

**\*wird vom Assistenten vorbereitend durchgeführt**

Im heutigen Versuch bekommen Sie Proben, die Fraktionen von humanem Plasma enthalten. Diese Fraktionen (F1-F5) wurden gewonnen als das Plasma einer Anionenaustauscherchromatographie (AAC) unterzogen wurde. Die AAC diente dem Zweck, Antikörper von den restlichen Plasmaproteinen zu trennen. Außerdem erhalten sie mit F0 Vollplasma, das nicht behandelt wurde.

Des Weiteren bekommen Sie je 2 Proben, die Serumalbumin (SA) bzw. Transferrin (TF) enthalten. Jeweils eine der Proben wurde in einem Vorversuch mit der Protease Chymotrypsin versetzt. Darüber hinaus erhält jeder eine Probe, die ein Ihnen unbekanntes Protein enthält. Das ist Ihre Analyse. Ihre Aufgabe besteht darin, diese Proben mit einem entsprechenden Probenpuffer zu versetzen, so dass Sie damit ein SDS-Polyacrylamidgel beladen können, um die in den Proben enthaltenen Proteine der Größe nach zu trennen.

Mit Hilfe des molekularen Gewichtsmarkers (MW) können Sie Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Proteine ziehen.

Sie sollen außerdem in Vorbereitung für den Versuch 7 einen Teil der durch SDS-Page getrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferieren (Western blot).

## 1. Ionenaustauscherchromatographie von Proteinen

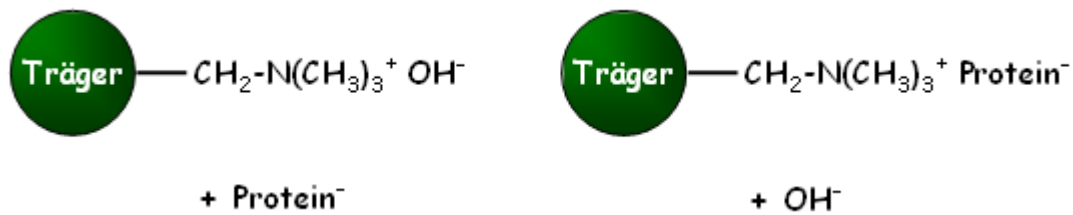
Unter Ionenaustauscher-Chromatographie versteht man eine Methode, bei der ein lösliches Ion gegen ein gleich geladenes Ion an einer unlöslichen Trägersubstanz ausgetauscht wird. Die im Labor genutzten Ionenaustauscher sind synthetische Träger, z. B. Polymere auf Polystyrolbasis (mit Quervernetzung). Auch modifizierte Zuckerpolymere werden häufig eingesetzt.

Die Kationenaustauscher enthalten Sulfonsäure (-SO<sub>3</sub>H), Carboxyl- (-COOH) oder phenolische Gruppen als funktionelle Gruppe. Nach der Dissoziationskonstante (pK) der ionischen Gruppen unterscheidet man stark saure (-SO<sub>3</sub>H) und schwach saure (-COOH) Austauscher. Die Anionenaustauscher enthalten basische Gruppen, z. B. -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (stark basisch) oder -N<sup>+</sup>H(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (schwach basisch).

### Wirkungsweise von Ionenaustauschern:



**Abbildung 2–1:** Die vom Kationenaustauscher gebundenen Kationen (Na<sup>+</sup>) werden durch Bindung entsprechend geladener Proteine (Protein<sup>+</sup>) verdrängt. Die Na<sup>+</sup>-Ionen erscheinen im Durchfluss der Säule. Die Elution der Proteine erfolgt durch Änderungen des pH-Wertes.



**Abbildung 2–2:** In diesem Beispiel werden die OH-Gruppen der quaternären Ammoniumbase des Anionenaustauschers durch negativ geladene Proteine (Protein-) verdrängt. Die Elution der Proteine erfolgt z.B. durch Änderungen des pH-Wertes.

Die Affinität eines Ionenaustauschers für ein Protein hängt von der Natur der geladenen Gruppe auf dem Träger ab und von der Natur und Anzahl der geladenen Gruppen auf der Proteinoberfläche. Je größer die Zahl der Ladungen eines Ions, umso fester wird das Protein an den Austauscher gebunden. Die Konzentration der Ionen, die Ionenstärke, beeinflusst ebenfalls die Bindung. In der Praxis spielen u. U. auch die Proteingröße und die Quervernetzung (Größe der Löcher im Träger) eine Rolle. Die Ionenstärke wird berechnet nach:

$$I = \frac{1}{2} \sum c \cdot z^2 \quad c = \text{Konzentration}; z = \text{Ladungszahl}$$

Ionenaustauscher werden für viele Zwecke in der Medizin, Biochemie und Technik verwendet: Als Medikament zum Natriumentzug; zur Herstellung  $\text{Ca}^{2+}$ -armer Milch in der Diätetik; als Diagnostikum zur sondenlosen Funktionsprüfung der Magensaftsekretion. In der Biochemie werden Ionenaustauscher zur chromatographischen Trennung einer Vielzahl von Molekülen verwendet, z.B. von Proteinen oder Aminosäuren. In großem Umfang werden Ionenaustauscher zum Entsalzen von Lösungen, insbesondere zur Wasserenthärtung, verwendet.

Der Isoelektrische Punkt (pI) von Peptiden und Proteinen ergibt sich aus dem Verhältnis aller dissoziierbaren Gruppen. Die pI-Werte von Proteinen mit einem überwiegenden Anteil an sauren Aminosäuren liegen im sauren pH-Bereich; Proteine mit einem größeren Anteil an basischen Aminosäuren haben ihre pI-Werte im alkalischen. Liegt der pH-Wert einer Pufferlösung unterhalb des pI-Wertes eines Proteins ist die Gesamtladung des Proteins positiv; liegt er oberhalb, ist die Summe der Ladungen negativ.

Im folgenden Versuch werden humane Plasmaproteine (siehe Tabelle 2.1) verwendet, die durch Anionenaustausch-Chromatographie auf DEAE-Sephacel getrennt wurden. (Versuch wurde bereits vom Assistenten durchgeführt). DEAE-Sephacel ist ein schwach basischer Anionenaustauscher aus Diethylaminoethyl (DEAE =  $-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$ ) substituierter Cellulose. Cellulose dient hier als Trägermaterial; die Trennung der Proteine erfolgt über ionische Wechselwirkungen mit den positiv geladenen DEAE-Gruppen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers.

Unter den Startbedingungen der Chromatographie (pH 8,6) sind die Plasmaproteine negativ geladen und werden über elektrostatische Wechselwirkungen an den Ionenaustauscher gebunden. Die Elution der Immunglobuline (pI 8,3) erfolgt bei pH 7,0. Unter diesen Bedingungen bleiben die übrigen Plasmaproteine aufgrund ihrer niedrigeren pI-Werte (z.B. Albumin pH 5,6) an die Säule gebunden und können anschließend, durch Pufferwechsel zu einem Puffer mit niedrigerem pH, bei pH 4,2 eluiert werden. Die Analyse der Eluate erfolgt in der SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE).

**Tabelle 2-1:** Wichtige Proteine des Blutplasmas (g/l)

	<b>Frauen</b>	<b>Männer</b>	<b>Kinder</b>
Präalbumin	0,15 - 0,30	0,20 - 0,30	0,04 - 0,12
Albumin	38,00 - 51,00	40,00 - 52,00	28,00 - 41,00
$\alpha$ 1-Antitrypsin	0,95 - 1,85	0,85 - 1,85	0,60 - 1,60
Orosomukoid	0,50 - 1,00	0,55 - 1,15	0,10 - 0,40
$\alpha$ 2-Makroglobulin	2,05 - 4,30	1,80 - 3,40	2,35 - 5,30
Haptoglobin	0,50 - 2,70	0,55 - 3,20	< 0,20
Ceruloplasmin	0,25 - 0,55	0,20 - 0,45	0,05 - 0,25
Transferrin	1,65 - 2,90	1,54 - 2,75	0,90 - 1,90
Hemopexin	0,60 - 0,95	0,65 - 0,95	0,04 - 0,30
C3-Komplementfaktor	0,80 - 1,85	0,90 - 1,90	0,70 - 1,15
C4-Komplementfaktor	0,20 - 1,00	0,30 - 1,25	
Fibrinogen	1,90 - 4,70	1,80 - 4,50	
IgG	7,20 - 15,50	6,70 - 14,70	5,50 - 12,70
IgA	0,50 - 3,00	0,50 - 3,00	< 0,10
IgM	0,20 - 2,10	0,15 - 1,20	0,02 - 0,12

## 2. Proteolytischer Verdau

### **Physiologische/Medizinische Bedeutung:**

Proteolytische Prozesse sind für eine Vielzahl physiologischer Funktionen essentiell: Sie haben entweder katabolen Charakter oder sind an regulierten Prozessen beteiligt, der sogenannten limitierten Proteolyse: Beispiele für limitierte Proteolyse: z.B. wird die Blutgerinnung durch eine Kaskade von proteolytischen Schritten reguliert, durch die als Zymogen vorliegende Enzyme aktiviert werden und letztendlich aus Fibrinogen das unlösliche Fibrin entsteht. Hämophilie kann durch das Fehlen oder die Mutation eines der beteiligten Proteine, z.B. Faktor IX, eine Serinprotease, hervorgerufen werden. Weitere Beispiele sind die Aktivierung von Prohormonen wie Proinsulin und Wachstumsfaktoren durch Abspaltung eines Peptides.

Proteasen, die an katabolen Prozessen beteiligt sind, sind beispielsweise die Enzyme der Pankreas, zu denen auch Chymotrypsin gehört.

Proteasen besitzen mehr oder weniger breite Spezifität für gewisse Peptidbindungen. In diesem Versuch sollen Sie die entstehenden Spaltprodukte von Serumalbumin und Transferrin nach einem Verdau mit Chymotrypsin analysieren. Transferrin ist ein Glykoprotein, das in der Leberzelle synthetisiert wird, und ist für den Eisentransport im Serum verantwortlich. Es hat zwei Bindungsstellen für Eisenionen. Die Aminosäuresequenz von Transferrin wird in Tabelle 2-1 angegeben. Der Verdau von Serumalbumin (SA) und Transferrin (TF) wurden bereits vom Assistenten durchgeführt. Die Proteinfragmente werden am heutigen Versuchstag mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt und die Proteine auf dem Gel mit dem Farbstoff Coomassie blue angefärbt.

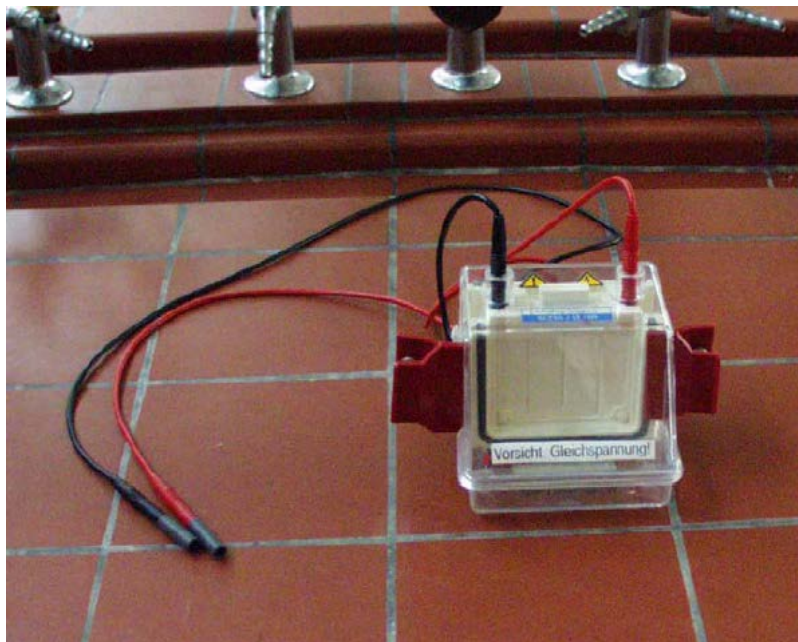
### 3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

#### Grundlagen:

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese kann man Proteine der Größe nach trennen. Die Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld wird beeinflusst durch deren Ladung, Größe und Form. Um die Faktoren Ladung und Form eines Proteins aufzuheben, werden diese vor der Elektrophorese mit SDS (Sodiumdodecylsulfat) versetzt. Dies ist ein anionisches Detergenz, das die Proteine in der Probe denaturiert (Aufhebung der individuellen Form des Proteins) und an diese denaturierten Proteine stöchiometrisch bindet: Alle zwei Aminosäuren lagert sich ein SDS-Molekül an das Protein an. Die Proteine werden somit abhängig von ihrem Molekulargewicht negativ geladen. Es entsteht ein konstantes Ladungs/Masse Verhältnis. Der hohe Ladungsüberschuss, der durch das SDS eingebracht wird übersteigt die natürliche Eigenladung des Proteins erheblich, so dass diese vernachlässigbar wird.

Die Wandergeschwindigkeit wird nun nur noch von der Größe der Proteine bestimmt, die durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgeles zu einer unterschiedlichen Wanderungstrecke führt.

SDS kann nur nicht kovalente Bindungen aufheben. Um intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken in Proteinen zu spalten, werden die Proben vor Auftrag auf das Polyacrylamidgel mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert.



**Abbildung 2–3:** Zwei Gelelektrophoresekammer mit Deckel (im Bild rechts unten und im Bildmitte). Zwischen den beiden befindet sich das Spannungsgerät, das in der Lage ist, gleichzeitig zwei Kammern zu versorgen.

Acrylamid ist das Material der Wahl, um Proteine nach Größe elektrophoretisch zu trennen. Acrylamid bildet zusammen mit Bisacrylamid ein quervernetztes Netzwerk, wenn ein Radikalstarter zugesetzt wird. Bei Verwendung von hohen Konzentrationen an Acrylamid und Bisacrylamid erhöht man den

Grad der Quervernetzung und verringert die Porengröße, so dass kleine Proteine gut aufgetrennt werden. Für große Proteine verwendet man niedrigprozentige Gele.

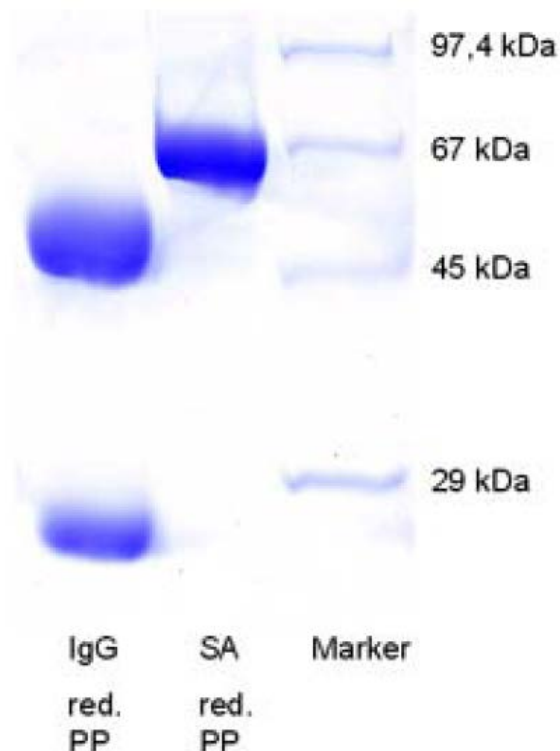
15% - 12,5% für Proteine bis 50kDa

5% - 10% für Proteine > 100kDa

Um eine optimale Auflösung der Proteine zu erhalten, werden zweischichtige Gele verwendet. Den unteren Teil nennt man Trenngel, den oberen Sammelgel. Letzteres hat eine geringere Konzentration an Acrylamid und einen anderen pH-Wert. In diesem Sammelgel werden die Proteine an einer gemeinsamen Startlinie, der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, gesammelt. Das Starten von einer gemeinsamen Linie ermöglicht eine sauberere Trennung der Proteine.

### Medizinische Bedeutung:

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) gehört zu den wichtigsten Untersuchungsmethoden der Biochemie. PAGE eignet sich sowohl zum Nachweis der Reinheit von Proteinen als auch zum Nachweis von Enzymmustern bzw. Proteinmustern (z.B. Diagnostik Proteinurie).



**Abbildung 2-4:** Humanes IgG und Serumalbumin (SA) wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und mit Hilfe eines SDS-Gels Ihrer Größe nach getrennt. Die Proteine wurden anschließend mit dem Farbstoff Coomassie Blue sichtbar gemacht.

**Geräte:**

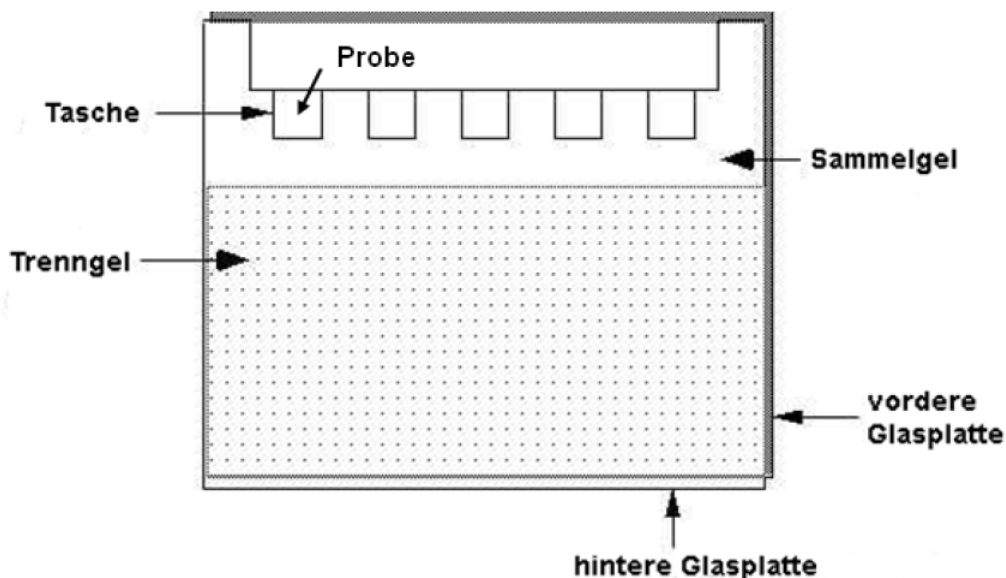
Mighty Small Elektrophorese Kammer  
Spannungsgerät

**Materialien:**

SDS-Polyacrylamidgele	gebrauchsfertig, 12% Acrylamid
Laufpuffer:	20 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3
Probenpuffer nicht reduzierend (4fach):	8% SDS, 40% Glycerin, 0.1% Bromphenolblau, 250mM TRIS/HCl, pH 6.8
Probenpuffer reduzierend(4fach):	wie nicht reduzierend, plus 10% $\beta$ -Mercaptoethanol
Coomassie-Färbelösung:	0.2% Coomassie Blue R250 in 50%MeOH, 5% HOAc
Entfärbelösung:	40% MeOH, 7% HOAc
Fixierlösung:	7% HOAc

**Aufgaben:**

1. Die Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie sollen im reduzierten und nicht reduzierten Zustand getrennt und die Hauptbanden anhand ihres Molekulargewichtes identifiziert werden.
2. Als Analyse soll das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins bestimmt werden.
3. Unbehandeltes und mit Chymotrypsin behandeltes Transferrin soll getrennt und die Molekulargewichte der auftretenden Banden bestimmt werden.
4. Plasma und zwei Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie der Plasmas sollen getrennt werden, um sie für den immunologischen Nachweis von IgG in Versuch 5 auf Nitrocellulose zu blotten.



**Abbildung 2-5:** Der Aufbau des PAGE-Sandwiches. Das Gel befindet sich zwischen zwei Glasplatten und besteht aus dem Sammeln gel und Trenngel. Die ausgesparten Taschen im Sammeln gel dienen zur Aufnahme der Proben.



**Durchführung:**

1. Probenvorbereitung:

- Rack dem Schema folgend mit Eppendorf-Reaktionsgefäßen befüllen und mit Probenamen beschriften („A1“ und „A2“ stehen beispielhaft für die durchnummerierten Analysenproben)
- Jeweils 5µl Probenpuffer (reduzierend bzw nicht reduzierend) in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettieren (gelbe Pipettenspitzen verwenden)
- 15 µl Probe dazugeben
- kurz zentrifugieren (Anweisung des Assistenten beachten, Achtung: Zentrifugen müssen immer austariert beladen werden)
- 3 min bei 90 °C inkubieren
- Erneut kurz zentrifugieren (Anweisung des Assistenten beachten)

2. Gelaufbau:

Da nicht polymerisiertes Acrylamid toxisch ist, erhalten Sie gebrauchsfertige, vollständig polymerisierte Gele. Diese 1 mm dicken Gele wurden zwischen zwei Glasplatten polymerisiert und verbleiben während der Trennung auch zwischen den Glasplatten. Im Sammelgel befindet sich ein Kamm. Wird dieser aus dem Gel herausgezogen, ergeben sich Aussparungen (Taschen), in die die Proteinproben aufgetragen werden.

- **Gel 1 und Gel 2 haben eine Trenngelkonzentration von 12% Polyacrylamid.**
- Die vorbereiteten Proben werden mit den speziellen ausgezogenen Spitzen (farblos) langsam in die Taschen eingefüllt. Der Molekulargewichtsmarker (MW) kann direkt, ohne Zugabe von **Probenpuffer PP**, aufgetragen werden (**10µl**).

**Beladung des Gels 1:**

(Fraktionen der Ionenaustauscherchromatographie)

Gel 1, 12%

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Probe	F0r	F1r	F2r	F3r	F4r	F5r	Nichts	Nichts	F0nr	F1nr	F2nr	F3nr	F4nr	F5nr	MW

r = reduzierter Probenpuffer

nr = nicht reduzierter Probenpuffer

**Beladung des Gels 2:**

Molekulargewichtsmarker MW, Analysen zur Molekulargewichtsbestimmung, proteolytische Verdaus von Serumalbumin (SA1, SA2) und Transferrin (TF1,TF2) und den Serum/Plasma Proben für den Westernblot.

Achtung: Bis auf Proben Nr. 10-12 alle Proben reduzieren!

Gel 2, 12%

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Probe	MW	A1r	A2r	SA1r	SA2r	TF1r	TF2r	Nichts	Nichts	F0nr	F5nr	F3nr	Nichts	F3r	MW

r = reduzierter Probenpuffer

nr = nicht reduzierter Probenpuffer

- Gelkammerdeckel aufsetzen (auf die richtige Polung achten), die Elektrophorese starten: 160 V, 200 mA, Dauer ca. 1 h, bis die Laufmittelfront (blau gefärbt durch Bromphenolblau) am unteren Ende des Gels angelangt ist.
- Spannung abschalten, Deckel abnehmen.
- Puffer aus der Kammer in den Ausguss abgießen und die Gele herausnehmen.
- Seitliche Trennstücke herausziehen und Glasplatte vorsichtig vom Gel trennen. Das Gel 2 mit den Analysen und den Proben den Assistenten für den Westernblot vorlegen. Dann mit einer Glasplatte bei Spur 8/9 (wo Sie nichts in die Taschen pipettiert haben) durchschneiden und die rechte Hälfte an die Assistenten geben. Die Verwendung des Gelstückes für den Westernblot wird unter B) beschrieben. Das Gelstück mit den Analyseproben und das Gel 1 mit den Ionenaustauscherfraktionen wird in eine Plastikschaale zu ungefähr 75 ml (halbvoll Schale) Coomassie-Färbelösung gegeben und 7 min auf dem Schüttler gefärbt.
- Dann das Gel ~1 h in Entfärbelösung entfärben. Dazu Coomassie-Lösung in entsprechende Recyclingflasche zurückfüllen, Gel kurz mit Wasser abspülen und Entfärbelösung zugeben.
- Entfärbelösung in entsprechende Recyclingflasche abgießen und Fixierlösung zugeben.
- Zusammen mit dem Assistenten das Gel mit der Videokamera fotografieren.

### Aufgabe für Gel 1:

1. Ionenaustauscherchromatographie von Plasma:  
Beschreiben Sie die Hauptbanden in den verschiedenen Fraktionen und die Änderungen des apparenten Molekulargewichts unter reduzierenden/ nicht-reduzierenden Bedingungen.

### Aufgaben für Gel 2:

1. Messen Sie die Laufstrecken der Markerproteine und ihres Analysenproteins mit Hilfe eines Lineals exakt aus und tragen Sie die Werte in die Tabelle ein.

Erstellen Sie in Excel ein Punktdiagramm mit den Laufstrecken [cm] als x-Werte und dem Logarithmus des Molekulargewichts [Da] als y-Werte (Befehl: „=log(Wert)“). Lassen Sie sich die Trendlinie anzeigen unter dem Menüpunkt Diagramm → Trendlinie hinzufügen. Die dazu gehörige Gleichung finden Sie unter dem Menüpunkt Diagramm → Trendlinie hinzufügen → Optionen → Gleichung im Diagramm darstellen. Rechnen Sie mit Hilfe dieser Gleichung das Molekulargewicht ihres Analyseproteins aus.

Zwei Probleme können auftreten:

1. Die 10 000 Dalton-Bande des Proteinmarkers kann aus dem Gel herausgelaufen sein.
  2. Abbaubanden der übrigen Markerproteine entstehen. Bei Unklarheiten Assistenten befragen.
2. Erläutern Sie anhand der auftretenden Bandenmuster welches SA bzw Transferrin mit Chymotrypsin versetzt wurde.

**Tabelle 2-1:** Die Sequenz des Transferrins (77 kDa), dargestellt in Ein-Buchstaben-Code. Das reife Serumtransferrin (75 kDa) beginnt mit Valin (AS 20). Die 19 AS lange Signalsequenz wurde beim Eintritt ins ER von der Signalpeptidase getrennt.

```

1  MRLAVGALLV CAVLGLCLAV PDKTVRWCAV SEHEATKCQS FRDHMKSVIP
51  SDGPSVACVK KASYLDCIRA IAANEADAVT LDAGLVYDAY LAPNNLKPVV
101 AEFYGSKEDP QTFYYAVAVV KKDSGFQMNQ LRGKKSCHTG LGRSAGWNIP
151 IGLLYCDLPE PRKPLEKAVA NFFSGSCAPC ADGTDFPQLC QLCPGCGCST
201 LNQYFGYSGA FKCLKDGAGD VAFVKHSTIF ENLANKADRQ QYELLCLDNT
251 RKPVDEYKDC HLAQVPSHTV VARSMGGKED LIWELLNQAQ EHFQKDKSKE
301 FQLFSSPHGK DLLFKDSAHG FLKVPVRMDA KMYLGYEYVT AIRNLREGTC
351 PEAPTDECKP VKWCALSHHE RLKCEWSVN SVGKIECVSA ETTEDCIAKI
401 MNGEADAMSL DGGFVYIAGK CGLVPVLAEN YNKSDNCEDT PEAGYFAVAV
451 VKKSASDLTW DNLKGGKKSCH TAVGRTAGWN IPMGLLYNKI NHCRFDEFFS
501 EGCAPGSKKD SSLCKLCMGS GLNLCEPNNK EGYGYTGAF RCLVEKGDVA
551 FVKHQVTPQN TGGKNPDPWA KNLNEKDYEL LCLDGTRKPV EYANCHLAR
601 APNHAVVTRK DKEACVHKIL RQQQHLFGSN VTDCSGNFCL FRSETKDLLF
651 RDDTVCLAKL HDRNTYEKYL GEEYVKAVGN LRCSTSSLL EACTFRRP

```

Chymotrypsin schneidet hinter aromatischen Aminosäuren. Wie viele Fragmente würden Sie erwarten? Wie erklären Sie die Anzahl der im Gel sichtbaren Banden?

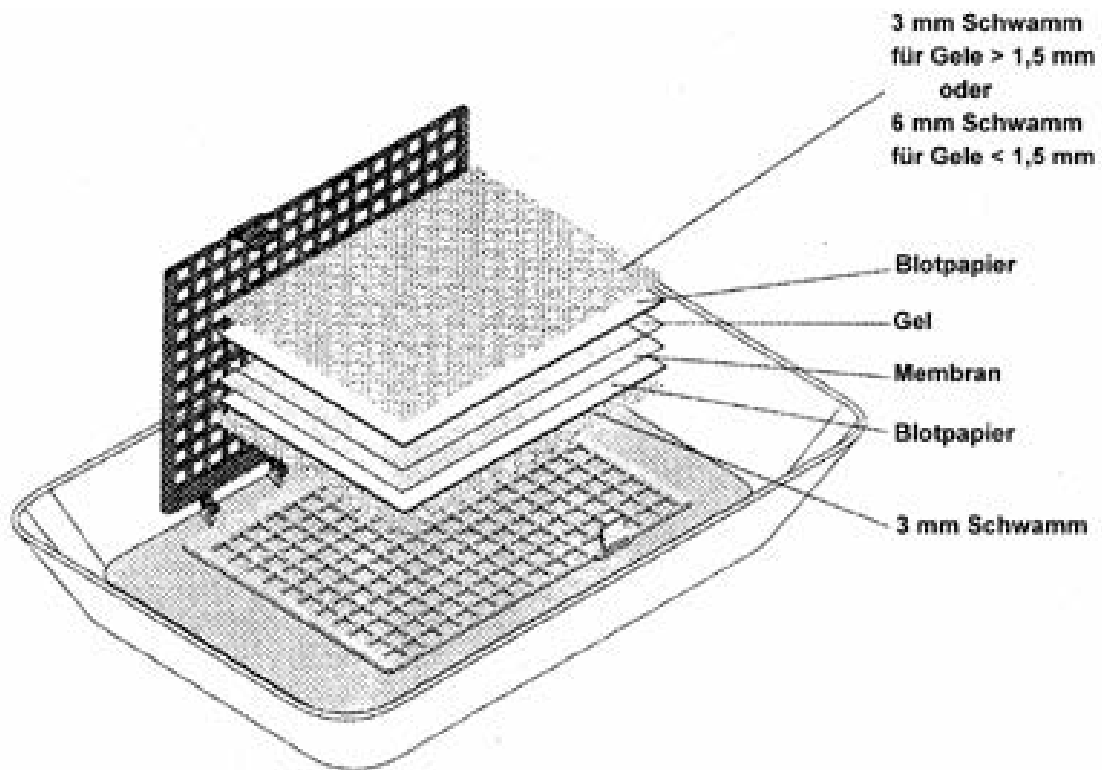
**Tabelle 2-2:** Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Q	Gln	L	Leu	S	Ser
R	Arg	E	Glu	K	Lys	T	Thr
N	Asn	G	Gly	M	Met	Y	Tyr
D	Asp	H	His	F	Phe	W	Trp
C	Cys	I	Ile	P	Pro	V	Val

## 4. Blotten der Proteine auf Nitrocellulose (Vorbereitung für Versuch 5)

### Grundlagen:

Dieser Versuch ist die Vorbereitung für den immunologischen Versuch 5. Die medizinische Bedeutung ist dort erläutert. Proteine, die mittels SDS-PAGE getrennt wurden, werden in dem sogenannten Blotting-Verfahren auf Nitrocellulose übertragen, auf der dann immunologische Nachweise durchgeführt werden können. Die Übertragung erfolgt wie bei der SDS-PAGE elektrophoretisch, d.h. die mit SDS beladenen Proteine werden von einem elektrischen Feld aus dem Gel heraus auf die Nitrocellulose-Membran transferiert. Da die Proteine negativ geladen sind, ist beim Aufbau der Transfereinheit darauf zu achten, dass sich die Nitrocellulose auf der Anodenseite befindet.



**Abbildung 2-5:** Schale mit schematischem Aufbau des Blot-Sandwiches

### Geräte:

Nitrocellulose  
Transphor Blotting Kammer

### Lösungen:

Transferpuffer: 50 mM Borsäure pH 8.5, 5% Methanol  
TBS + Tween  
TBS + 5% Milchpulver

**Durchführung:****Blotten:**

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das für den Western-Blot vorgesehene Gelstück (Spur 10-15) in eine Schale gelegt, die Transfer-Puffer enthält. Die Halterung für die Blotapparatur wird in eine Photoschale getaucht, die ebenfalls Transfer-Puffer enthält. Dabei ist auf folgende Anordnung zu achten:

- Die Halterung wird mit der grauen Seite (zukünftige Anode) zuunterst in die Schale gelegt.
- Auf diese wird nacheinander ein Schwamm, ein Whatman-Papier, die Nitrocellulose-Membran (mit Namen beschriften!), das Gel, wieder ein Whatman-Papier, ein Schwamm und zuletzt die schwarze Seite (zukünftige Kathode) der Halterung aufgelegt und eingerastet. Die einzelnen Schichten müssen jeweils luftblasenfrei aufgelegt werden.
- Dieser Sandwichaufbau wird in die Blotkammer überführt (Anode zu Anode, Kathode zu Kathode) und eine Stunde lang bei 1000 mA geblottet.
- Die Membranen werden eine Stunde lang in 5% Milchpulver geschüttelt, um alle noch freien Proteinbindungsstellen zu blockieren.
- Das Milchpulver wird mit TBS abgewaschen und die beschrifteten Membranen bis zum Versuch 7 eingefroren.



Chymotrypsin-Behandlung des Thrombin gespaltenen Peptids liefert zwei Dipeptide mit der Zusammensetzung Gly1 Phe1 und Arg1 Ser1 und das übrige Tetrapeptid. Formulieren Sie die Sequenz des Peptids in der Dreibuchstaben-Schreibweise.

15. Die vollständige Hydrolyse eines Peptids ergibt:

1 Gly, 1 Ala, 2 Cys, 1 Lys, 1 Glu, 1 Ile, 1 Thr, 1 Phe, 1 Val

Reduktion mit Mercaptoäthanol ergibt zwei kleinere Peptide A und B.

A enthält: Ala, Cys, Glu, Gly, Ile, Lys

Carboxypeptidase setzt Ile frei

Edman-Abbau mit Phenylisothiocyanat ergibt das PTH-Derivat von Gly im 1-Cyclus, Ala im 2-Cyclus. Trypsin setzt zwei Peptide frei:

a) enthält Glu und Ile

b) Ala, Cys, Gly, Lys

B enthält: Cys, Phe, Thr, Val

Carboxypeptidase setzt Val frei;

Chymotrypsin: Val und ein Tripeptid mit Cys, Phe, Thr;

Edman-Abbau ergibt PTH-Thr.

Wie lautet die Sequenz des gesamten Peptids?

16. Ein Peptid hat die folgende stöchiometrische Zusammensetzung:

1 Ala, 1 Arg, 2 Asp, 2 Glu, 3 Gly, 1 Leu, 3 Val

Die folgenden Peptide wurden nach partieller Spaltung isoliert:

1. Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala

2. Val-Asp-Val-Asp-Glu

3. Val-Asp-Val

4. Glu-Ala-Leu-Gly-Arg

5. Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg

6. Leu-Gly-Arg

Wie lautet die Aminosäuresequenz des Ausgangspeptids?