

Universität Ulm

SS2005

# Praktikum der Biochemie

## Versuch 9: Proteine

Durchführung am 14.04.2005

Gruppe 19

Dagmar Walter  
Christian Seelandt  
Eva Schönfeld  
Angela Hölzle

# 1 Denaturierung von Proteinen

In folgendem Versuchsteil sollte durch Zugabe von Schwermetallen (Kupfersulfat und Bleiacetat), Säuren (Salz – und Essigsäure) und Salzen (Ammoniumsulfat) eine Denaturierung von Serumproteinen hervorgerufen werden. Die Denaturierung führt aus unterschiedlichen Gründen zum Ausfällen der Proteine. Durch die Ammoniumsulfatfällung sollten zudem möglichst selektiv Immunglobuline (Ig) aus dem Serum gefällt werden, um später den Anteil der Ig an den Serumproteinen zu bestimmen.

## 1.1 Proteinfällung durch Schwermetalle

### 1.1.1 Material und Methoden

Zu 2 ml eines 1: 15 verdünnten menschlichen Serums wurden jeweils 2 Tropfen Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) – Lösung (5 %) bzw. Bleiacetat ( $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) – Lösung (5%) gegeben.

### 1.1.2 Ergebnisse

Nach der Zugabe der Kupfersulfat-Lösung wurde das zunächst klare Serum sofort trübe. Der Niederschlag setzte sich innerhalb einer halben Stunde am Boden des Reagenzglases ab. Dieselbe Reaktion war nach Zugabe von Bleiacetat zu beobachten.

### 1.1.3 Diskussion

Positiv geladene Metallionen wie in unserem Versuch  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  können negativ geladene Seitengruppen (besonders Carboxylatreste) von Proteinen neutralisieren. Es wird ein Komplex, in diesem Fall ein Chelatkomplex, ausgebildet. Durch den Verlust der negativen Ladungen in den Seitengruppen geht die Hydrathülle des Proteins verloren. Diese Dehydratisierung führt dazu, dass das Protein nicht mehr in Lösung gehalten werden kann und demzufolge ausfällt.

## 1.2 Säurefällung von Proteinen

### 1.2.1 Material und Methoden

Jeweils 2 ml eines 1:3 mit Wasser verdünnten Serums wurden mit 2 ml Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (4 %) bzw. 2 M Salzsäure (HCl) versetzt.

### 1.2.2 Ergebnisse

Die Zugabe von Essigsäure bewirkte keine sichtbare Fällung der Serumproteine. Salzsäure dagegen hatte Schaum- und Niederschlagsbildung zur Folge.

### 1.2.3 Diskussion

Die Zugabe einer Säure bewirkt die Protonierung von Seitengruppen (z.B. Carboxylatreste) und dadurch das Lösen von Wasserstoffbrücken. Dies führt zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins. Allerdings muss die Säure stark genug sein um diese Wirkung zu erzielen. Die 2 M Salzsäure ( $pK_S = -7$ ) ist fähig, die Proteine soweit zu protonieren, dass Serumproteine ausfallen. Essigsäure dagegen ist zu schwach ( $pK_S = 4,75$ ), so dass es nur zu wenigen Änderungen in der Tertiärstruktur von Proteinen kommt, wodurch es kein offensichtliches Ausfallen gibt.

### 1.3 Fällung von Immunglobulinen mit Ammoniumsulfat

Es wurden 0,5 ml Serum vorgelegt. Nacheinander wurden 0,2 ml und zweimal 0,1 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung  $\{(NH_4)_2SO_4\}$  (3,9 M) zugegeben und immer gut gemischt. Dadurch soll eine gleichmäßige Konzentration des Ammoniumsulfats im Reaktionsansatz erreicht werden. Würden die 0,4 ml Ammoniumsulfatlösung auf einmal zugegeben, so würden an der Grenze von Serum und Salzlösung durch die lokal erhöhte Salzkonzentration alle Proteine ausfallen (z.B. auch Albumin). Dies ist jedoch nicht erwünscht, da nur die Ig ausgefällt werden sollen, welche bei einer Salzkonzentration von etwa 44 % ausfallen. Nach 10 min wurden die gefällten Serumproteine für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 5 ml einer 1,79 M Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen. Dieser Schritt dient dem Zweck diejenigen Proteine wieder in Lösung zu bringen, die trotz der Vorsichtsmaßnahmen ausgefallen sind. Es wurde erneut für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 0,2 ml einer physiologischen Kochsalzlösung aufgenommen.

Die Reinheit der Probe wurde mittels Elektrophorese (siehe Punkt 4) und der Proteingehalt photometrisch (siehe Punkt 3) bestimmt. Für letzteres wurde eine 1:200 Verdünnung mit Wasser angesetzt. Die Ammoniumsulfatfällung beruht auf der Wechselwirkung der Ionen mit Wasser im Lösungsmittel. Das zugegebene Ammoniumsulfat hat die größere Ionenstärke und wird deshalb bevorzugter von einer Hydrathülle umgeben als das Protein. Dadurch wird der Verlust der Hydrathülle des Proteins bewirkt, wodurch dieses ausfällt.

## 2 Reinigung von Immunglobulinen (Ig) durch Affinitätschromatographie

2 ml Vollserum wurden 3 – mal auf eine Protein A – Sepharosesäule aufgetragen. Dabei binden spezifisch die Ig mit ihrem  $F_C$  – Teil an das Protein A unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (WBB), van – der – Waals – Kräften etc. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml 1 x PBS gewaschen, damit die nichtgebundenen Proteine, vor allem die, die keine Immunglobuline sind, herausgespült werden. Eine reversible Denaturierung der Ig erfolgt mit einer 0,1 M Essigsäure / 0,15 M NaCl - Lösung (2,5 ml), d.h. Carboxylatgruppen werden protoniert, es können sich deshalb keine WBB mehr ausbilden. Somit lösen sich die Immunglobuline von dem Protein A und befinden sich in dem Eluat. Es kommt zudem zu einer Konformationsänderung des Proteins bzw. der Ig.

Schließlich werden die ersten 15 Tropfen, die aus der Säule kommen, verworfen, da sie nur aus PBS bestehen. Die restlichen Tropfen wurden in 100  $\mu$ l 2 x PBS aufgenommen und somit renaturiert.

Die Ig – Lösung wurde für die folgende Proteinkonzentrationsbestimmung mit Wasser 1:200 verdünnt. Zum Schluss wurde die Säule mit einer 3 M Harnstofflösung (5 ml) gereinigt, um die restlichen Proteine zu entfernen und schließlich wurde das Protein A mit 5 ml einer 0,025 M Tris / HCl / 2 M NaCl - Lösung renaturiert.

### 3 Quantitative Auswertung der Aufreinigung der Immunglobuline

#### 3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bindet ein blauer Farbstoff (Coomassie - Brilliant - Blue) an die basischen Gruppen der Proteine. Hierbei lässt sich sagen, dass die Intensität der Färbung proportional zur Menge des Proteins in Lösung ist.

In unserem Versuch wurde die Absorption bei 578 nm gemessen und die ermittelten Extinktionswerte in einer gegebenen Eichgerade (siehe Anhang) eingetragen und so die Proteinkonzentrationen ermittelt.

Hierzu wurden zu 0,9 ml Bradford – Reagenz 0,1 ml der verdünnten Probe gegeben. Der Nullabgleich erfolgt mit 0,1 ml Wasser.

#### 3.2 Ergebnisse:

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der photometrischen Bestimmung aufgetragen.

Probe	Extinktion	VF	Konzentration [mg/ml]	prozentualer Anteil [%]
Wasser	0	0	0	0
Vollserum	0,28	1/1000	78	100
Säulenuat	0,44	1/200	9,4	12,05
Ig aus $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Fällung	1,3	1/200	79	101,3

Da die Ig eine 2 – 3 fach geringere Bindung des Coomassie – Farbstoffes aufweisen muss die Konzentration noch mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

Des Weiteren ist das Volumen des Eluats geringer (ca. 1,1 ml) als das der ursprünglichen Probe, d.h. es muss noch mit dem Faktor  $\frac{1,1}{2}$  multipliziert werden.

$$\Rightarrow c_{\text{Eluat}} = 9,4 \text{ mg/ml} \cdot 2 \cdot \frac{1,1}{2} = 10,34 \text{ mg/ml}$$

$\Rightarrow$  13,26 % des Vollserums sind Immunglobuline.

Das Volumen der Kochsalzlösung (0,2 ml), in welchem das Pellet nach der zweiten Zentrifugation resuspendiert wird, ist geringer als das der ursprünglichen gefällten Probe, d.h. es muss hier noch zusätzlich mit dem Faktor  $\frac{2}{5}$  multipliziert werden.

$$\Rightarrow c_{\text{Fällung}} = 79 \text{ mg/ml} \cdot 2 \cdot \frac{2}{5} = 63,2 \text{ mg/ml}$$

$\Rightarrow$  81,03 % des Vollserums sind Immunglobuline.

### 3.3 Diskussion

Da der Literaturwert bei 16 % liegt, könnte der Fehler bei der Säulenchromatographie durch falsches Pipettieren des Eluats zu Stande gekommen sein.

Normalerweise sollten die beiden prozentualen Anteile der Immunglobuline in etwa gleich sein, bei der Aufreinigung durch Ammoniumsulfatfällung etwas mehr. Letztere ist nicht so spezifisch wie die Säule. Es sind neben den Ig auch solche Proteine ausgefallen, die bei einer geringeren Salzkonzentration als 44 % gefällt werden. Die viel zu große Menge könnte durch einen Pipettierfehler bei der Verdünnung entstanden sein. Des Weiteren waren in der verdünnten Lösung Flocken, d.h. es kam möglicherweise zur Streuung und somit zu einem weiteren Messfehler.

## 4 Elektrophoretische Trennung von Proteinen

Zur Reinheitsprüfung der Proteine aus Punkt 1.3 und 2 wurde eine Elektrophorese auf Celluloseacetat – Folien durchgeführt.

### 4.1 Material und Methoden

Zunächst wurde der leicht basische (pH 8,3) Elektrophoresepuffer in die Trennkammer des Elektrophoresegeräts bis zur Markierung eingefüllt. Danach wurde die Celluloseacetat – Folie ebenfalls mit Puffer gesättigt und in den Spannrahmen der Trennkammer eingebracht. Anschließend wurde jeweils ein Tropfen der Proteinlösung und zum Vergleich normales Humanserum auf die Celluloseacetat – Folie aufgetragen. Der verwendete basische Puffer sorgt dafür, dass die Seitengruppen der Proteine negativ geladen sind und die Protein somit zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Größe und Ladung des jeweiligen Proteins ab. Eine geringe Größe und starke Ladung bewirkt dabei eine schnelle Wanderung. Zur Trennung der Proteine wurde die Elektrophoresekammer an das Netzgerät für 26 Minuten (250 V; 12 mA) angeschlossen. Nach der Elektrophorese wurde die Celluloseacetat – Folie mit dem Farbstoff Ponceau S für 10 Minuten eingefärbt und dadurch die aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht.

### 4.2 Ergebnisse

Beim Vollserum waren fünf Banden zu sehen, wobei Albumin die stärkste Bande markierte. Die gewünschten Immunglobuline wanderten am geringsten.

Bei der Probe aus der Ammoniumacetatfällung war eine starke Bande bei der Kathode zu sehen, welche die Anwesenheit von Ig anzeigte. Diese Bande war jedoch nicht scharf abgegrenzt sondern über einen weiten Bereich verwischt.

Die Probe aus der Trennung durch Affinitätschromatographie zeigte eine deutlich abgegrenzte Bande bei den Immunglobulinen.

### 4.3 Diskussion

Die Elektrophorese zeigte deutlich die höhere Spezifität der Affinitätschromatographie im Vergleich zur Ammoniumsulfatfällung. Bei ersterer Trennmethode war nur eine scharfe Bande zu sehen, wohingegen bei letzterer keine klare Abgrenzung zu sehen war. Dies deutet darauf hin, dass bei der Ammoniumsulfatfällung nicht ausschließlich Immunglobuline gefällt wurden, sondern auch noch Proteine, die bei einer geringeren Salzkonzentration ausfielen. Die Affinitätschromatographie liefert nur die gewünschten Ig.

# Protokoll

## **Versuch 9: Proteine – Proteindenaturierung, Proteinreinigung, Proteinelektrophorese und Proteinkonzentrationsbestimmung**

*Verfasser:* Adrienne Heilig, Daniela Vetter, David Meyer, Jan Röhrbein

*Gruppe:* 8

*Termin:* Mittwoch, 13.04.2005

*Dauer:* 14.00 – 19.30 Uhr (Seminar – Praktikum – Seminar)

### **Protokollgliederung:**

- Einleitung
- Versuch 1: Denaturierung von Proteinen
- Versuch 2: Aussalzen mit Ammoniumsulfat
- Versuch 3: Reinigung von Immunglobulinen durch Affinitätschromatographie
- Versuch 4: Elektrophoretische Trennung von Proteinen
- Versuch 5: Photometrische Konzentrationsbestimmung
- Fehleranalyse

### **Einleitung:**

In diesem Versuch untersuchen wir das Verhalten von Proteinen auf verschiedene Denaturierungs- und Fällungsmethoden. Des Weiteren wird durch die Affinitätschromatographie und Ammoniumsulfataussalzung die spezifische Reinigung von Immunglobulinen aus Vollserum bewirkt.

Die daraus gewonnene Ausbeute wird quantitativ photometrisch mittels Bradford-Reagenz untersucht. Zur qualitativen Untersuchung wenden wir die Elektrophorese an.

### **Versuch 1: Denaturierung von Proteinen**

Durch Zugabe verschiedener Agenzien kann bei Proteinen eine Konformationsänderung (Denaturierung) bewirkt werden, die zur Ausfällung des Proteins in Flüssigkeit führt:

1.) Zu jeweils 2ml Vollserum (1:15; 1:15; 1:3; 1:3) werden 2ml Kupfersulfat, 2ml Bleiacetat, 2ml Salzsäure, 2ml Essigsäure hinzugefügt. Wir haben unterschiedliche Ausfallverhalten beobachtet.

- Zugabe von Schwermetallionen (Kupfersulfat und Bleiacetat): Die Schwermetallkationen binden an die reaktiven Carboxylgruppen der Aminosäuren und neutralisieren die Ladung. Das führt zu einer Dehydratisierung und zu einem Ausfall der Proteine.

Beim Kupfersulfatreagenz beobachten wir eine starke Fällung der Proteine, die sich in einem milchig-trüben türkisfarbenen Gemisch äußert.

Auch bei Bleiacetat beobachten wir eine milchig-weiße Fällung.

Die Fällung und damit die Denaturierung sind irreversibel, d.h., die Proteine können nach der Zerstörung ihrer räumlichen tertiären Struktur diese nicht wieder annehmen und sind so in ihrer biologischen Funktion unwiderruflich gestört.

- Zugabe von Säure (Salzsäure und Essigsäure): Auch durch Säuren werden Proteine denaturiert, da ihre Protonen auf die Carboxylgruppe übertragen werden und diese somit ihre negative Ladung verliert. Dadurch werden die ionischen Wechselwirkungen aufgehoben und die Wasserstoff-Brückenbindungen zerstört.

Wir haben bei dem HCl-Reagenz eine stärkere Fällung als bei dem Essigsäure-Reagenz (kaum eine Fällung zu erkennen) beobachtet. Dies liegt daran, dass HCl eine stärkere Säure ist als die Essigsäure und somit eher bestrebt und in der Lage ist, ihre Protonen abzugeben.

In den nächsten beiden Versuchen isolieren wir allein die Immunglobuline aus einem Vollserum. Hier wenden wir zwei verschiedene Techniken an: Aussalzen mit Ammoniumsulfat und das Reinigen durch die Affinitätschromatographie.

## **Versuch 2: Aussalzen mit Ammoniumsulfat**

Verschiedene Proteine fallen bei für sie spezifischen Salzkonzentrationen aus dem Vollserum aus. Uns ist bekannt, dass Immunglobuline bei einem Ammoniumsulfatgehalt von 44% ausfallen.

Durch das Salz wird den Proteinen Wasser entzogen und sie verlieren ihre Hydrathülle und fallen deshalb aus. Das Salz „konkurriert also erfolgreich“ mit den Proteinen um die Wassermoleküle.

In 0,5ml Vollserum geben wir zunächst 0,4ml 100%ige Ammoniumsulfatlösung, da diese im Vollserum auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden. Es fallen hierbei aber nicht nur die Immunglobuline, da es trotz portionsweiser Zugabe (0,2ml, 0,1ml, 0,1ml) der Ammoniumsulfatlösung zu lokalen Erhöhungen der Salzkonzentration kommt. Somit isolieren wir nicht nur die Immunglobuline, sondern auch Protein, die bei anderen Salzkonzentrationen dehydratisiert werden.

Nun zentrifugieren wir das Gemisch und erhalten einen Kern (Pellet) der ausgefallenen Proteine. Die Flüssigkeit über dem Pellet schütten wir ab.

Wir geben nun auf das Pellet 5ml 44%ige Ammoniumsulfatlösung. Hier müssen wir keine Verdünnung mehr berücksichtigen, da sich durch das Zentrifugieren keine Flüssigkeit mehr im Reagenzglas befindet.

Durch die Salzzugabe gehen alle Proteine die erst bei einer höheren Salzkonzentration ausfallen wieder in Lösung und nur die Immunglobuline bleiben als feste Substanz am Reagenzglasboden zurück.

Durch erneutes Zentrifugieren und Abschütten der Flüssigkeit erhalten wir die isolierten Immunglobuline, welche wir in 0,2 ml einer physiologischen Kochsalzkonzentration wieder lösen und somit renaturieren.

### **Versuch 3: Reinigung von Immunglobulinen durch Affinitätschromatographie**

Bei diesem Versuch machen wir uns die spezifische Bindungsaffinität der Proteine an bestimmte Substrate zunutze.

Ein Substrat wird kovalent als Ligand an ein Trägermaterial in der Säule gebunden. In unserem Fall verwenden wir Protein A, das vom *Staphylococcus aureus* gebildet wird, als Ligand. Protein A ist in der Lage, Immunglobuline (IG`s) an der Fc-Region nicht-kovalent zu binden.

Diesen Liganden immobilisieren wir also, indem wir ihn an unser Trägermaterial, die Sepharose, binden. Wir erhalten eine Protein-A-Sepharose-Säule.

- Nun geben wir mit einer Spritze 2ml Vollserum über die Säule. Die Immunglobuline und das Protein A bilden nun untereinander Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Bindungen aus.

Dieser Durchlauf wird noch zweimal wiederholt, um möglichst viel Immunglobulin an Protein A zu binden.

- Anschließend werden 10ml Phosphatpuffer (1xPBS) auf die Säule gegeben. Dadurch wird, unter Erhaltung des vorherrschenden pH-Milieus, die Säule von nicht brauchbaren Proteinen und anderen Stoffen gereinigt.

- Durch die Zugabe einer 0,1M Essigsäure/ 0,15M NaCl-Lösung bewirken wir nun eine reversible Denaturierung sowohl des Proteins A, als auch der Immunglobuline unter Zerstörung der **nicht**-kovalenten Bindungen.

Das abgelöste Eluat, das die IG`s enthält, kann nun aufgefangen werden.

- Die 15 zuerst ablaufenden Tropfen werden verworfen, da sie nur den Phosphatpuffer enthalten, der nach der ersten Spülung als Rückstand in der Säule verblieben ist.

15 weitere Tropfen– sie enthalten nun die IG`s und Essigsäure- werden in einem Eppi aufgefangen, in dem sich bereits 100µm doppelt konzentrierten Phosphatpuffers befinden. Dieser Puffer fängt die Essigsäure auf und puffert sie ab, gleichzeitig bewirkt er ein neutrales Milieu und renaturiert die IG`s.

Die so gewonnene IG-Lösung wird für die Elektrophorese aufbewahrt. In einem weiteren Eppi stellen wir eine 1:200 –Verdünnung her:

5µl Säuleneluat + 1000µl Wasser.

Diese Verdünnung benutzen wir später zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz.

Um die Säule für den erneuten Gebrauch zu reinigen spülen wir sie mit 5ml Harnstoff. Dieser denaturiert stärker als die zuvor verwendete Essigsäure, wodurch die restlichen IG`s abgelöst werden.

Mit 5ml 0,025M Tris/HCl/2M NaCl-Lösung wird die Säule wieder in ihren Ausgangszustand gebracht: Protein A wird somit wieder renaturiert.

#### 4: Elektrophoretische Trennung von Proteinen

Bei der elektrophoretischen Trennung werden die von uns zuvor bei der Ammoniumsulfatfällung und der Affinitätschromatographie gereinigten Immunglobuline mit der Proteinzusammensetzung im Vollserum verglichen. Anhand dieser Methode untersuchen wir die Wirksamkeit dieser beider Reinigungsmethoden. Die verschiedenen Proben werden dabei zunächst auf eine in einen leicht basischen Elektrolysepuffer (pH 8,3) eingelegte Cellulose-Acetat-Folie aufgetragen. Der pH von 8,3 bewirkt eine Protonenabgabe der Proteine. So kommt es zur negativ-Ladung mit einem daraus resultierenden gleichgerichteten Proteinwanderungsstrom von der Kathode zur Anode. Die Folie wird dann zwischen zwei Trennkammern gespannt, welche ebenfalls bis zur so genannten Fülllinie mit dem Puffer gefüllt sind. Zur Trennung wird die Elektrolysekammer für 26min bei 250 Volt und 12mA an das Netzgerät angeschlossen.

Die Trennung erfolgt nach Größe **und** unter Berücksichtigung der Gesamtnegativladung der Proteine. Kleine Proteine sind schneller als Große, stark negativ geladene sind schneller als schwach negative.

Anschließend wird die Cellulose-Acetat-Folie für 10min gefärbt und zuletzt einige Male für je 3min mit Leitungswasser wieder entfärbt. Dabei bindet der spezifische Farbstoff nur an die Proteine, der Überschuss kann abgewaschen werden.

So erhalten wir für die Serumproteine ein Bandenmuster, an dem wir die verschiedenen Konzentrationen von Albumin,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Globulin ablesen können.

Die Normwerte sind folgende (s. Reihenfolge oben): 60%, 3,5%, 7,5%, 12% und 17%.

Bei der elektrophoretischen Bestimmung kann nur eine qualitative, nicht jedoch eine quantitative Analyse durchgeführt werden.

Man kann deutlich erkennen, dass die Aussalzung mit Ammoniumsulfat ungenauere Ergebnisse liefert als die Affinitätschromatographie, da die Affinitätschromatographie direkt auf das spezifische Bindungsstreben der Immunglobuline abzielt.

#### Versuch 5: Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die aus dem Vollserum isolierten Immunglobuline sollen auf ihre Konzentration überprüft werden. Diese kann photometrisch mittels Bradford-Reagenz gemessen werden. Im Bradford-Reagenz befindet sich ein blauer Farbstoff (100mg Coomassie-brilliant blue G250, sowie 50ml 96%iges Ethanol und 100ml Phosphorsäure → mit Aqua bidest. auf 1L aufgefüllt), welcher an Proteine bindet.

Dieses Reagenz geben wir zu 1:200 verdünnter Immunglobulinlösung, die aus der Ammoniumsulfataussalzung und aus der Affinitätschromatographie gewonnen wurden, sowie zum Vollserum. Als Referenz verwenden wir eine Kuvette, die mit Wasser und Bradford-Reagenz gefüllt ist. Bei 595nm, dem Extinktionsmaximum des Farbstoffes, ermitteln wir photometrisch die Absorption.

Folgende Werte haben wir photometrisch ermittelt:

	Extinktion	nach Eichkurve	Verdünnung
Vollserum	<b>0,37</b>	<b>65µg/ml</b>	<b>1:1000</b>
Protein A - Eluat	<b>0,15</b>	<b>20µg/ml</b>	<b>1: 200</b>
Amm.sulf.-Fällung	<b>0,31</b>	<b>52µg/ml</b>	<b>1: 200</b>

Die Konzentrationen der Proteine entnehmen wir der Eichkurve.  
Berechnungen:

Gesamtkonzentrationen im Serum: [Protonen] =  $65\mu\text{g/ml} \times 1000 = 65000\mu\text{g/ml}$   
= 65mg/ml

[Eluat] =  $20\mu\text{g/ml} \times 200 \times 2 \times (1,1\text{ml}/2\text{ml}) = 4400\mu\text{g/ml} = 4,4\text{mg/ml}$

[Fällung] =  $52\mu\text{g/ml} \times 200 \times 2 \times (0,2\text{ml}/0,5\text{ml}) = 8320\mu\text{g/ml} = 8,32\text{mg/ml}$

Bei den Berechnungen der Konzentrationen ist es wichtig, auf die Verdünnung der Lösung zu achten sowie auf die Bindung an den Farbstoff. Immunglobuline weisen eine 2-3-fach geringere Bindung an Coomassie-brilliant-blue auf, daher multiplizieren wir mit dem (Näherungs-)Faktor 2.

Um den Anteil der extrahierten Immunglobuline aus dem Vollserum zu erfassen berechnen wir:

[Eluat]/ [Protonen] = 0,068 ; entspricht 6,8%

[Fällung]/ [Protonen] = 0,128 ; entspricht 12,8%

### **Fehleranalyse:**

Unsere Ergebnisse der Aussalzung und der Affinitätschromatographie weichen deutlich voneinander ab.

Als bei den Versuchsbeschreibungen nicht erwähnte Hauptfehlerquellen vermuten wir:

1: Eventuell wurde bei der Affinitätschromatographie nicht vollständig eluiert.

2: Bei der Ammoniumsulfatfällung können auch Proteine ausgefallen sein, die bei ähnlichen Salzkonzentrationen dehydratisieren und ausfallen, jedoch keine Immunglobuline sind.

## **Protokoll Versuch 9**

### **Thema: Proteine – Proteindenaturierung, Proteinreinigung, Proteinelektrophorese, Proteinkonzentrationsbestimmung**

#### **Versuch 4.1.1: Proteinfällung durch Schwermetalle**

##### **Einleitung und theoretische Grundlagen**

Jedes einzelne der vielen Proteine im menschlichen Körper besitzt eine einzigartige dreidimensionale Struktur. Proteine können in vier hierarchisch aufgebaute Konformationsebenen eingeteilt werden: Primär-, Sekundär-, Tertiär-, und Quartärstruktur. Um sich räumlich anzuordnen, gehen Proteine verschiedene Wechselwirkungen bzw. Bindungen ein. Dazu gehören: Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbeziehungen, Hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte.

Die Zerstörung der intakten räumlichen Struktur – infolge der Lösung der eben genannten Bindungen – bezeichnet man als Denaturierung und führt meist zum Funktionsverlust des Proteins. Man unterscheidet zwischen einer reversiblen und einer irreversiblen Denaturierung.

In dem hier zu protokollierenden Versuch gelingt die Denaturierung in Art und Weise einer Fällung durch Schwermetalle.

##### **Versuchsaufbau**

a) In einem Reagenzglas werden 2 ml menschliches Serum (Verdünnung 1:15) mit 2 Tropfen einer 5%-igen Kupfersulfat-Lösung versetzt.

b) In einem Reagenzglas werden 2ml menschliches Serum (Verdünnung 1:15) mit 2 Tropfen einer 5%-igen Bleiacetat-Lösung versetzt.

### **Versuchsergebnis**

a) Nach Zugabe der Kupfersulfat-Lösung verfärbt sich das Serum. Es wird trüber und milchig. Ein Ausflocken ist nicht zu beobachten.

b) Nach Zugabe der Bleiacetat-Lösung verfärbt sich das Serum. Es wird trüber, jedoch nicht so trüb wie bei a)

### **Erklärung**

Aminosäuren, aus denen die Proteine bestehen, besitzen als funktionelle Gruppen mindestens eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe.

Die Carboxylgruppe, die in einer Umgebung deprotoniert wird, die oberhalb des isoelektrischen Punktes liegt, und somit als Carboxylatgruppe vorliegt, bindet Schwermetallkationen: bei a ) Kupferkationen, bei b) Bleikationen.

Serumproteine haben ihre isoelektrischen Punkte bereits im schwach sauren Bereich, daher kann man die Fällung von Serumproteinen in neutraler Umgebung untersuchen (Carboxylgruppe deprotoniert schon im neutralen Bereich, nicht erst im basischen!) Wenn Proteine in Lösung vorliegen (hier im Serum) so sind sie von einer Hydrathülle umgeben.

Durch die folgende Neutralisation (Proteinanion + Schwermetallkation) der Ladung, dehydratisiert das Protein bzw. der Protein-Schwermetallkomplex.

So ergibt sich folgendes Schema:

Das dehydratisierte Protein ist somit nicht mehr löslich und fällt aus, was man im Versuch anhand der milchig-trüben Färbung erkennen kann.

## **Versuch 4.1.2: Säurefällung von Proteinen**

### **Einleitung und theoretische Grundlagen**

Eine weitere Möglichkeit der Denaturierung ist die Säurefällung. Dabei werden ebenfalls nicht-kovalente Bindungen gelöst und die Tertiärstruktur aufgelöst. Bei Säurezugabe werden Protonen übertragen, die dann zur Zerstörung dieser Bindungen führen.

### **Versuchsaufbau**

- a) In einem Reagenzglas werden 2 ml Serum (Verdünnung 1:3) mit 2 %-iger Essigsäure im Verhältnis 1:1 gemischt.
- b) In einem Reagenzglas werden 2 ml Serum (Verdünnung 1:3) mit 2 molarer Salzsäure im Verhältnis 1:1 gemischt.

### **Versuchsergebnis**

- a) Nach Zugabe der 2%-igen Essigsäure verfärbt sich das Serum nicht. Es ist auch nach 10 Minuten keine Veränderung im Vergleich zum Ausgangsserum zu erkennen.
- b) Nach Zugabe der 2 molaren Salzsäure tritt kurze Zeit später eine Trübung des Serums ein.

### **Erklärung**

Bei Zugabe einer Säure lagern sich die Protonen der Säure an die Carboxylgruppe der Aminosäure. Dadurch werden die bestehenden Ionenbindungen zwischen der Carboxylgruppe und der Aminogruppe zerstört. Zudem werden auch die Wasserstoffbrückenbindungen gelöst. Dies führt zur Veränderung der Tertiärstruktur, was letztendlich zum Ausfallen des Proteins führt.

Bei Teilversuch a) gelingt die Fällung nicht, da Essigsäure mit einem pKs-Wert von 4,8 eine relativ schwache Säure ist. Es geschieht nur in geringen Maße eine reversible Denaturierung.

Bei Teilversuch b) gelingt die Fällung, da Salzsäure mit einem pKs-Wert von -6 eine sehr starke Säure ist und somit „leicht“ Protonen an die Carboxylgruppe des Proteins abgibt.

## Versuch 4.1.3: Fällung von Immunglobulinen mit Ammoniumsulfat

### Der Mechanismus des Aussalzens

In Wasser gelöste Proteine sind von einer Hydrathülle umgeben. Wird zu einer solchen Lösung ein Salz gegeben, in diesem Fall das Ammoniumsulfat  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , so dissoziieren die Salzionen und bilden durch Ion-Dipol-Wechselwirkungen eine eigene Hydrathülle aus – die Wasserdipole lagern sich um die Anionen und Kationen herum an. Je mehr Salzionen nun in die Lösung gebracht werden, um so mehr Wassermoleküle werden von ihnen „gebunden“, d.h. sie konkurrieren mit den Proteinen um die Wasserdipole. Erreicht die Salzkonzentration eine gewisse Sättigung, so reicht die Wechselwirkung zwischen dem Protein und den Wasserdipolen seiner Hydrathülle nicht mehr aus. Als Folge löst sich die Hülle auf und das Protein fällt aus.

Für das Aussalzen verwendet man in der Regel Salze mit einer großen Ionenstärke (mehrfach negativ oder positiv geladene Ionen, kleiner Teilchenradius), weshalb z.B. das Ammoniumsulfat dem Kochsalz vorgezogen wird.

### Zum Versuch

In diesem Versuch geht es darum, Immunglobuline aus menschlichem Serum zu isolieren. Immunglobuline fallen aus der Lösung aus, wenn die Salzkonzentration des verwendeten Ammoniumsulfats eine Sättigung von 44% erreicht (100% entspricht 3,9 M).

Ausgehend von 0,5 ml Serum in einem Plastikröhrchen gibt man langsam in drei Schritten geringe Mengen einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung (3,9 M) hinzu und schüttelt jeweils die Lösung sorgfältig. Dies macht man, bis im dritten Schritt die gewünschte Salzkonzentration von 44% (1,72 M) erreicht ist und die Immunglobuline ausfallen. Bei diesem Vorgang treten zwei Phänomene auf: zum einen fallen Proteine aus, die bei einer geringeren Konzentration denaturieren, und zum anderen Proteine, die bei einer *höheren* Konzentration denaturieren. Letzteres geschieht, weil beim Zugeben der 100% gesättigten Salzlösung die Salzionen zuerst lokal konzentriert sind und eine gewisse Zeit brauchen, um sich gleichmäßig in der Lösung zu verteilen.

Nach 10 min wird die Lösung mit den ausgefallenen Immunglobulinen und anderen Proteinen in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, da dieser ja noch Proteine enthält, die bei einer höheren Konzentration denaturieren. Das Pellet (der Bodensatz) wird mit einer 44%-igen (1,72 M) Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen, d.h. die Immunglobuline und früher ausfallende Proteine bleiben denaturiert, während die später ausfallenden Proteine, die anfangs durch die lokal erhöhte Salzkonzentration ausgefallen sind, renaturieren und wieder in Lösung gehen.

Es wird nochmal zentrifugiert und danach der Überstand, d.h. die renaturierten, später ausfallenden Proteine, verworfen. Übrig bleibt das Pellet mit den gewünschten Immunglobulinen (und früher ausfallende Proteine, die hier aber unterschlagen werden). Um weitere Versuche mit den Immunglobulinen durchführen zu können, gibt man eine physiologische Kochsalzlösung (das „natürliche“ Milieu) zum Pellet hinzu und schüttelt kräftig. Dadurch renaturieren die Immunglobuline und gehen wieder in die Lösung.

### Diskussion

Warum werden bei der Versuchsdurchführung zwei verschieden konzentrierte Salzlösungen verwendet, d.h. anfangs eine 3,9 M Ammoniumsulfat-Lösung (100% gesättigt) und zum Waschen eine 1,72 M Ammoniumsulfat-Lösung (44% gesättigt)? Da man zu Beginn des Versuchs Serum nimmt, das die gelösten Proteine enthält (aber noch kein Ammoniumsulfat), wird die zugegebene Salzlösung verdünnt und ihre Konzentration nimmt ab; die Salzionen verteilen sich anstatt auf 0,2 ml Lösung im ersten Schritt auf

0,2 ml Lösung plus 0,5 ml Serum, d.h. die Konzentration fällt von 3,9 M auf 1,11 M. Bei weiterer Zugabe der vollständig gesättigten Salzlösung wird die Salzkonzentration im Reagenzglas weiter angehoben und erreicht schließlich die gewünschte Sättigung von 44% (1,72 M). Würde man statt der vollständig gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung nur die 44%-ige Lösung nehmen, so müsste man viel größere Mengen an Salzlösung zugeben, um die Verdünnung durch das Serum auszugleichen (theoretisch ließe sich die 44%-ige Sättigung sogar nur annähern, aber nicht erreichen). Beim späteren Waschvorgang kann man direkt die 44%-ige Ammoniumsulfat-Lösung zugeben, weil das Reagenzglas nur das feste Pellet, aber sonst keine Flüssigkeit enthält – die zugegebene Lösung wird hier nicht verdünnt.

Wenn man die Salzkonzentration kennt, bei der Albumin aus dem Serum ausfällt, dann kann man auf entsprechende Weise genauso Albumin aus dem Serum reinigen.

Bei der Durchführung des Versuchs konnte wie erwartet die Ausfällung von Proteinen beobachtet werden, da sich die Lösung nach Zugabe der Ammoniumsulfat-Lösung trübte. Nach der Zentrifugation zeigte sich ein weißlicher Bodensatz. Bei der Renaturierung der Immunglobuline durch die physiologische Kochsalzlösung am Ende des Versuchs löste sich das Pellet vollständig auf und erzeugte so eine leicht milchige Lösung.

## **Versuch 4.2: Reinigung von Immunglobulinen durch Affinitätschromatographie**

### **Thema**

Um Immunglobuline aus menschlichem Serum zu reinigen, kann man die Affinitätschromatographie benutzen. Hierbei bindet man einen für die Proteine spezifischen Liganden kovalent an ein festes Trägermaterial, wie z.B. Sepharose. Gibt man nun das Serum wiederholt über diese „Säule“, werden die gewünschten Proteine nicht-kovalent von den Liganden gebunden, während alle anderen im Serum befindlichen Stoffe nicht mit diesen interagieren.

Anschließend spült man diese ungewollten Stoffe mit Hilfe eines Phosphatpuffers wieder aus, der zum einen dafür sorgt, dass sich der vorhandene pH-Wert nicht ändert und zum anderen nur die nicht gebundenen Proteine entfernt, während er auf die vorhandenen Bindungen keine Auswirkungen hat.

Auf das übrig gebliebene Material gibt man dann eine leichte Säure oder Base, welche die Eigenschaft hat, die nicht-kovalent gebundenen Proteine, sowie die dafür spezifischen, kovalent an das Trägermaterial gebundenen Liganden reversibel zu denaturieren.

Hierdurch lösen sich die nicht-kovalenten Bindungen und das gewollte Protein wird eluiert, wohingegen die Liganden kovalent an das Trägermaterial gebunden bleiben.

Durch erneute Zugabe einer Pufferlösung, lassen sich die nun vom Restserum getrennt aufgefangenen Proteine dann wieder renaturieren.

### **Versuchsablauf**

Für unseren Versuch war bereits eine fertige Säule mit dem Trägermaterial Sepharose und dem kovalent daran gebundenen Liganden Protein-A vorbereitet. Protein-A hat die Eigenschaft Immunglobuline nicht-kovalent zu binden und half uns so dabei, diese aus dem uns zur Verfügung gestellten menschlichen Serum zu reinigen.

Wir gaben 2ml des Serums mit einer luftblasenfreien Spritze über die Säule, fingen das durchgelaufene Gemisch wieder auf und wiederholten diesen Vorgang mit dem jeweiligen Auffangserum insgesamt zwei Mal.

Dann gaben wir 10ml 1x PBS, einen Phosphatpuffer, über die Säule, um das restliche, nicht benötigte Serum aus der Säule zu spülen. Das nun insgesamt aufgefangene Gemisch konnte verworfen werden.

Um die nicht-kovalent an Protein-A gebundenen Immunglobuline zu eluieren, verwendeten wir 0,1M Essigsäure/0,15M NaCl-Lösung. Die ersten gelösten 15 Tropfen wurden verworfen und erst die zweiten 15 Tropfen in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen und zu Renaturierung der Immunglobuline mit 100µl 2x PBS versetzt.

Mit 5µl dieses Säuleneluats und 1000µl Wasser stellten wir in einem zweiten Eppendorf-Gefäß gleich anschließend ein 1:200 Gemisch her, das für weitere Versuche benötigt wurde.

Um die Säule für die nächsten Versuchsdurchläufe der anderen Gruppen wieder vorzubereiten, ließen wir zuerst 5ml 3M Harnstoff durchlaufen, der auch die letzten in der Säule verbliebenen Serumreste denaturieren konnte. Anschließend durchspülten wir sie mit weiteren 5ml einer 0,025 M Tris/HCL/ 2 M NaCl-Lösung (pH 9,0), die das Ausgangsmilieu der Säule wiederherstellte.

### **Diskussion**

Das Serum wird insgesamt drei Mal über die Säule gegeben, um sicher zu gehen, dass auch an alle freien Liganden Immunglobuline binden können.

Die ersten 15 Tropfen des Eluats müssen verworfen werden, weil darin fast nur Puffer enthalten ist. Dieser wurde im Schritt zuvor durch die Säule gegeben und deshalb am Anfang mit hinausgespült.

Da sich die Flüssigkeitsmenge der 2x PBS durch die Zugabe des Eluats beim Auffangen der zweiten 15 Tropfen ungefähr verdoppelt, teilt sich somit die Konzentration und es liegt im Endgemisch wieder eine 1x PBS vor.

## **Versuch 4.3: Quantitative Auswertung der Aufreinigung der Immunglobuline**

### **Thema**

Um die Proteinmenge einer Lösung photometrisch zu bestimmen, kann man sie der Methode nach Bradford unterziehen. Hierbei wird der zu untersuchende Stoff mit dem Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue“ versetzt, der an die basischen Gruppen der Proteine bindet und eine Blaufärbung letzterer bewirkt.

Die Intensität dieser Färbung steht in einem linearen Verhältnis zu der in der entsprechenden Lösung enthaltenen Proteinmenge. Die Extinktion lässt sich mit Hilfe des Photometers bei 595nm, dem Absorptionsspektrum des Farbstoffes, messen und über verschiedene Schritte in die Stoffkonzentration umrechnen.

### **Versuchsablauf**

Zur Messung dreier Lösungen mit dem Photometer bereiteten wir vier unterschiedliche Küvetten mit 1000µl Bradford-Lösungen vor.

Küvette 1 sollte als Referenz-Lösung dienen und wurde deshalb nur mit 100µl Wasser versetzt.

In die Küvetten 2,3 und 4 gaben wir ebenfalls jeweils 100µl des verdünnten Vollserums, des verdünnten Säuleneluats aus Versuch 4.2 und der verdünnten Ammoniumsulfatlösung aus Versuch 4.1.

Die daraus ermittelten Extinktionswerte dienten uns zur Berechnung der Immunglobulin-Konzentration, die jeweils in den Ausgangsflüssigkeiten vorliegen sollte.

Unsere Photometermessung ergab:

Vollserum:	0,54
Protein-A-Eluat:	0,28
Ammoniumsulfat:	0,06

Mit Hilfe der Bradford-Eichkurve konnten wir die zu den Extinktionswerten gehörenden Konzentrationen ermitteln und diese dann nach noch weiteren Vorgaben berechnen. So musste man den Wert für das Vollserum auf Grund der 1000fachen Verdünnung mit dem Faktor 1000 multiplizieren und erhielt so eine Konzentration von 100mg/ml. Der Wert für das Protein-A-Säuleneluat musste ebenfalls wegen der Verdünnung mit dem Faktor 200 multipliziert werden. Wegen der 2-3fach geringeren Bindung der Immunglobuline an den Coomassiefarbstoff erfolgte außerdem eine Multiplikation mit dem Faktor 2 und abschließend mit dem Faktor 1,1:2. Letztere ist durch das, auf Grund der ersten verworfenen 15 Tropfen, von 2ml auf 1,1 ml geschrumpfte Volumen begründet. Nach all diesen Rechnungen ergab sich eine Konzentration von 9,9 mg/ml, was ca. 10% des Vollserums beträgt.

Zur Berechnung der Konzentration aus der Ammoniumsulfatfällung waren ebenfalls mehrere Schritte notwendig. So war die Multiplikation mit den Faktoren 200 und 2 gleich. Die Volumenänderung bei diesem Versuch erforderte jedoch eine weitere Multiplikation mit dem Faktor 0,2/0,5.

Daraus errechneten wir einen Wert von 1,6 mg/ml, was ca. 1,6 % des Vollserums beträgt.

### **Diskussion**

Die Unterschiede zwischen den erwarteten und den von uns ermittelten Werten können von unsauberem Arbeiten oder aber auch tatsächlich von der Norm abweichenden Proteinkonzentrationen in unseren Lösungen herrühren.

Arbeitsfehler sind jedoch wahrscheinlicher.

Auch sollten die Konzentrationen in den Küvetten 3 und 4 aus den Versuchen 4.1 und 4.2 mit einem Wert von 17-19 mg/ml, also ca. 18 % des Vollserums, eigentlich übereinstimmen.

Die bei uns sehr deutlichen Abweichungen lassen sich ebenfalls mit unsauberem Arbeiten begründen. Dies kann vor Allem bei den Verdünnungsvorgängen schwerwiegende Auswirkungen auf die resultierenden Proteinkonzentrationen haben.

## **Versuch 4.4: Elektrophoretische Trennung**

### **Einleitung und theoretische Grundlagen**

Die Wanderung von geladenen Proteinen in einem elektrischen Feld bezeichnet man als Elektrophorese. Mithilfe der Elektrophorese kann man eine Mischung von mehreren Proteinen nach ihrer Größe bzw. ihrer elektrischen Ladung auftrennen. Im Allgemeinen reinigt man jedoch nur kleinere Proteinmengen, da einfachere Alternativen zur Verfügung stehen und sich die Elektrophorese negativ auf die Struktur und somit auch auf die Funktion der Proteine auswirken kann.

Die zu trennenden Proteine werden auf ein Trägermaterial aufgetragen, an das ein elektrisches Feld angelegt wird. Dieses bewirkt, dass die Proteine verschieden schnell wandern, da sie unterschiedlich groß sind und verschiedene Gesamtladungen aufweisen. Generell gilt: Proteine mit negativer Gesamtladung wandern zur Anode, Proteine mit positiver Gesamtladung wandern zur Kathode. Am schnellsten laufen Proteine auf dem Trägermaterial, die eine hohe Gesamtladung und/oder ein niedriges Molekulargewicht besitzen. So wandert z.B. Albumin mit einem Molekulargewicht von 60 kDa schneller als

das Immunglobulin G mit einem Molekulargewicht von 146 kDa. Alpha1-Lipoprotein, das mit einem Molekulargewicht von 200-400 kDa ein relativ großes Protein ist, läuft schneller in Richtung Anode, da es sehr stark negativ geladen ist.

Es gibt verschiedene Arten der Elektrophorese, wie z.B. die Papierelektrophorese und die Gelelektrophorese. Bei ersterer wird als Trägermaterial Celluloseacetat verwendet, bei letzterer Polyacrylamid. Eine besondere Form der Gelelektrophorese ist die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), die meist in Kombination mit SDS (sodium dodecylsulfate) durchgeführt wird. Die SDS-Moleküle tragen selbst eine negative Ladung und binden gleichermaßen an alle Proteine, d.h. die Eigenladung der Proteine spielt keine Rolle mehr und die Proteinmoleküle werden nur noch nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

### **Zum Versuch**

In unserem Versuch verwenden wir eine der wichtigsten Arten der Papierelektrophorese, nämlich die im klinischen Alltag oft verwendete Serumweißelektrophorese. Hierbei werden die verschiedenen Proteine im Blut in 5 verschiedene Fraktionen aufgeteilt: die Albumine, alpha1-, alpha2-, beta, und gamma-Fraktion.

Die verwendeten Proben stammen aus den vorausgegangenen Versuchen zur Proteinfällung durch Aussalzung (4.1.3) und zur Affinitätschromatographie (4.2). Als Referenz wird außerdem eine Probe mit normalem Humanserum aufgetragen.

Die Proben werden auf Seite der Kathode in gleicher Höhe auf die Celluloseacetat-Folie aufgetragen; anschließend wird ein elektrisches Feld erzeugt (250 V, 12mA).

Nach der Elektrophorese werden die so entstandenen Banden mithilfe von Poinceau-Sichtbar gemacht. Nun ergibt sich folgendes Bandenmuster:

Da die Proben aus Versuch 4.1.3/4.2 fast ausschließlich gereinigte Immunglobuline enthalten, ist in diesen Probenabschnitten nur eine Bande sichtbar, nämlich die der Immunglobuline. Der Abschnitt des normalen Humanserums zeigt das typische Muster mit 5 Banden (Albumin, alpha1, alpha2, beta, gamma-Globulin). Alle Banden auf der Celluloseacetat-Folie waren zwar nur schwach sichtbar, entsprachen aber den Erwartungen.

### **Quellenangabe**

Löffler, Petrides Biochemie & Pathobiochemie, S. 88-91

Königshoff, Brandenburger Biochemie, S. 89-95

Zeck Chemie für Mediziner, S. 90/91

Praktikumsskript Versuch 9