

Arbeitsgruppe D 6      Clara Dees  
 Susanne Duncker  
 Anja Hartmann  
 Kristin Hofmann

### Kurs 3: Proteinanalysen

Im heutigen Kurs extrahierten wir zum einen Proteine aus verschiedenen Geweben eines Kaninchens und führten eine Gelelektrophorese durch, um die Proteine zu identifizieren, und zum anderen analysierten wir die Proteinkonzentration einer Probe uns unbekannter Zusammensetzung sowie die Proteinkonzentration in den von uns zuvor hergestellten Proben der Kaninchengewebe.

#### *SDS-Gelelektrophorese von Proteinen*

Um eine SDS-Gelelektrophorese durchführen zu können, wurden zunächst die Zellen der Proben aufgeschlossen. Zur Analyse bekamen wir 83 mg Kaninchenleber, 79 mg Kaninchenmuskel sowie 2 ml Hefezellsuspension.

Die tierischen Zellen wurden nach dem Auftauen jeweils mit der vierfachen Menge an Extraktionspuffer in Eppendorfröhrchen gegeben und mit einem Plastikpistill gründlich homogenisiert. Danach wurden die Proben vier Minuten lang bei 13000 Upm zentrifugiert. Je 100 µl geklärtes Extrakt wurde entnommen und in einem neuen Eppendorfröhrchen auf Eis gestellt.

Die Hefezellen sind aufgrund der pflanzlichen Zellwand stabiler, daher wurde hier eine andere Extraktionsmethode angewandt. Die Hefezellsuspension wurde zunächst vier Minuten bei 7000 Upm zentrifugiert, das überschüssige Medium wurde abgeschüttet. Da beim Abschütteln Verwirbelungen aufgetreten waren, wurde die Hefe nochmals für vier Minuten bei 7000 Upm zentrifugiert, das restliche Medium mit einer Pipette entfernt. Um die Zellwand aufzuschließen, wurden die Zellen mit 200 µl Extraktionspuffer versetzt und mit 100 µl Glasperlen sechs Minuten bei Raumtemperatur im Vortexschüttler geschüttelt. Nach vierminütigem Zentrifugieren bei 13000 Upm wurden 50 µl Extrakt entnommen und in einem neuen Eppendorfgefäß auf Eis gestellt.

Bei der Vorbereitung der SDS-Gelelektrophorese wurden die Extrakte sowie die unbekannte Probe jeweils mit einer bestimmten Menge Wasser sowie Auftragspuffer vermischt (s. Tabelle 1) und die Lösungen fünf Minuten lang bei 95 °C inkubiert. Danach wurden sie eine Minute lang bei 6000 Upm zentrifugiert.

Probe und Probenmenge	Wassermenge	Auftragspuffermenge
5 µl Kaninchenleberextrakt	50 µl	100 µl
5 µl Kaninchenmuskelextrakt	50 µl	100 µl
10 µl Hefeextrakt	5 µl	5 µl
10 µl unbekannte Probe	10 µl	10 µl

Tabelle 1: Zusammensetzung der Proben für die SDS-Gelelektrophorese

Die so vorbereiteten Proben sowie die von den Betreuern vorbereiteten Proben (Serum, Blut, IgG, Erythrozyten) und der Molekulargewichtsstandard wurden auf das ebenfalls vorbereitete 11%ige SDS-Gel, das sich in der aufgebauten Gelkammer befand, aufgetragen. Dabei wurde von links nach rechts folgende Reihenfolge eingehalten: MW-Marker, Muskel, Leber, Serum, Blut, IgG, Erythrozyten, Hefeextrakt, unbekannte Probe, MW-Marker.

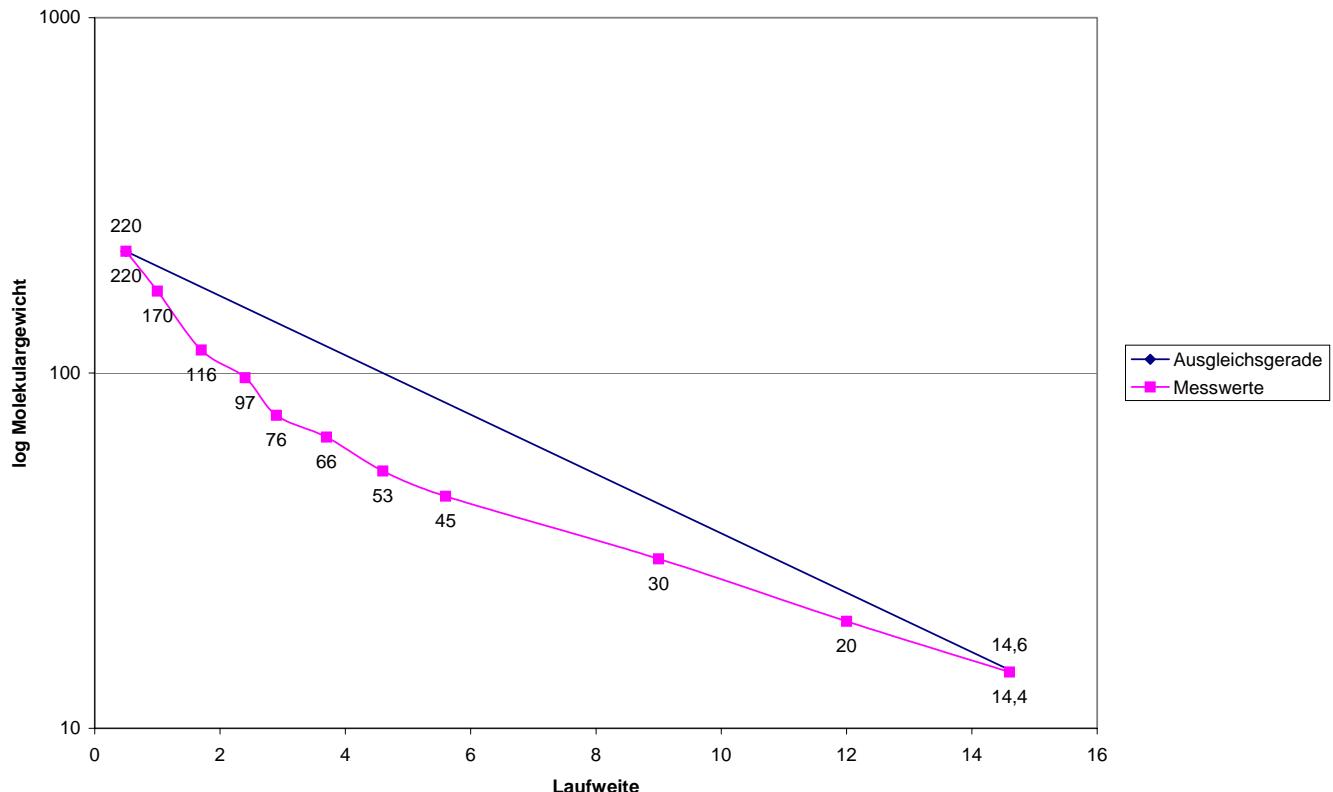
Es wurde ein Strom von 40 mA (20 mA pro Gel, je zwei Gruppen benutzten eine Gelkammer) und eine Spannung von 250 V eingestellt und gewartet, bis die blau gefärbte Pufferfront das Ende des Gels erreicht hatte.

Das Gel wurde für 20 min in Färbelösung geschwenkt, dann zweimal 15 min lang in Entfärbler I, danach 10 min in Entfärbler II. Das entfärbte Gel wurde fotografiert, das Foto befindet sich im Anhang dieses Protokolls.

Die Laufweite der Markerproteine wurde gegen ihr der Anleitung entnommenen Molekulargewicht aufgetragen und so die Eichkurve erstellt (Werte siehe Tabelle 2). Anhand der Ausgleichsgeraden konnte das Molekulargewicht der einzelnen Proben anhand ihrer Laufweite abgelesen werden.

Band	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Laufweite	0,5	1	1,7	2,4	2,9	3,7	4,6	5,6	9	12	14,6
kDa	220	170	116	97	76	66	53	45	30	20	14
Protein			beta-Galaktosidase	Phosphorylase b		Serumalbumin		Ovalbumin		Troponin	Lysozym

Tabelle 2: Werte für die Eichkurve



### Auswertung der SDS-Gelelektrophorese

Die folgenden Angaben in kDa entsprechen den im Elektrophoresegel sichtbaren Proteinbanden.

- Muskel
  - o 97 kDa: Hierbei handelt es sich vermutlich um Phosphorylase b, das ein Molekulargewicht von 97400 Da hat.
  - o 66 kDa: Hierbei könnte es sich um Serumalbumin handeln, das ein Molekulargewicht von 66200 Da hat.
  - o 45 kDa: Dies könnte die Bande von Ovalbumin sein, das ein Molekulargewicht von genau 45000 Da hat.
  - o ca. 42 kDa: Die Bande unterhalb der 45 kDa-Marke könnte Actin mit einem Molekulargewicht von 41200 Da entsprechen. Dies würde gut in das erwartete Proteinmuster eines Muskels passen.
  - o unterhalb der 45 kDa-Marke sind noch weitere Banden zu sehen. Eine davon könnte Troponin mit 37 kDa entsprechen, eine weitere GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) mit 36 kDa.
  - o Eine Bande bei ungefähr 34 kDa könnte Tropomyosin entsprechen, was ebenfalls gut ins Proteinmuster eines Muskels passen würde, da es oft mit Actin assoziiert ist.
- Leber

- 97 kDa: Bei dieser Bande handelt es sich vermutlich um Phosphorylase b, die ein Molekulargewicht von 97400 Da hat.
- 66 kDa: Diese Bande entspricht wahrscheinlich Serumalbumin, das ein Molekulargewicht von 66200 Da hat.
- 45 kDa: Ovalbumin könnte aufgrund seines Molekulargewichts von genau 45 kDa dieser Bande entsprechen.
- 40 kDa: GAPDH oder Troponin
- Serum
  - 66 kDa: Im Vergleich mit dem Proteinstandard handelt es sich bei der beim Serum deutlich sichtbaren Bande wahrscheinlich um Serumalbumin, das ein Molekulargewicht von 66200 Da hat.
- Blut
  - 14 kDa: Im Vergleich mit dem Proteinstandard stellt die beim Blut besonders deutlich sichtbare Bande ganz unten bei ca. 14 kDa vermutlich Hämoglobin dar, das ein Molekulargewicht von 14400 Da hat.
- IgG
  - Die Probe des Antikörpers IgG zeigt zwei deutliche Bande. Diese beiden Banden entsprechen vermutlich den beiden Proteinketten, aus denen Antikörper bestehen, der leichten Kette, die die untere Bande hervorruft, und der schweren, die sich in der oberen Bande abbildet.
- Erythrozyten
  - Die Bande bei ca. 66 kDa im Vergleich mit dem Proteinstandard entspricht vermutlich Serumalbumin, das ein Molekulargewicht von 66200 Da hat.
  - Bei 45 kDa liegt im Proteinstandard Ovalbumin, was auf eben dieses Protein in der Probe deutet.
  - 14 kDa: Bei der Erythrozytenprobe liegt bei ca. 14400 Da eine Bande, was laut dem Proteinstandard Hämoglobin wäre und auch gut zu der erwarteten Protein Zusammensetzung von Erythrozyten passen würde.
- Hefeextrakt
  - Beim Hefeextrakt hebt sich keine Bande deutlich hervor, es liegt ein Gemisch vieler verschiedener Banden vor. Dies liegt daran, dass eine Hefezelle ein ganzer Organismus ist und somit den kompletten Stoffwechsel eines Organismus in sich vereinigt. All die Proteine zeigen sich in unserer Gelelektrophorese.
- unbekannte Probe
  - Die unbekannte Probe liegt auf ungefährer Höhe des Proteinstandards mit 45 kDa, was vermuten lässt, dass es sich um Ovalbumin handeln könnte.

### *Fehleranalyse*

Die durchgeführte Analyse hing stark von der Verwendung verschiedener Geräte (Zentrifuge, SDS-Gelkammer) ab, was die Ergebnisse mit einem systematischen Fehler versieht.

Mögliche zufällige Fehlerquellen, die die von uns ermittelten Ergebnisse beeinflusst haben, können sein:

- unzureichendes Aufschließen der Zellen durch Homogenisieren über eine zu kurze Zeitspanne
- Abschütten eines Teils der Hefezellen nach der Zentrifugation
- ungenaue Dosierung des Auftragspuffers
- fehlerhafte Laufweitenbestimmung bei der Gelelektrophorese

### *Quantitative Proteinbestimmung*

Um eine Proteinprobe unbekannter Zusammensetzung zu analysieren, bereiteten wir zunächst Proteinstandards (BSA = Bovines Serum-Albumin) vor, um eine Eichkurve zur Proteinbestimmung herzustellen. In Tabelle 4 sind die hergestellten Proben in ihrer Zusammensetzung beschrieben.

Proteinstandard-Menge	Wassermenge
0 µg	100 µl
1 µg	99 µl
2,5 µg	97,5 µl
5 µg	95 µl
7,5 µg	92,5 µl
10 µg	90 µl
12,5 µg	87,5 µl
15 µg	85 µl
20 µg	80 µl

Tabelle 4: für die Eichkurve hergestellte Proteinstandards

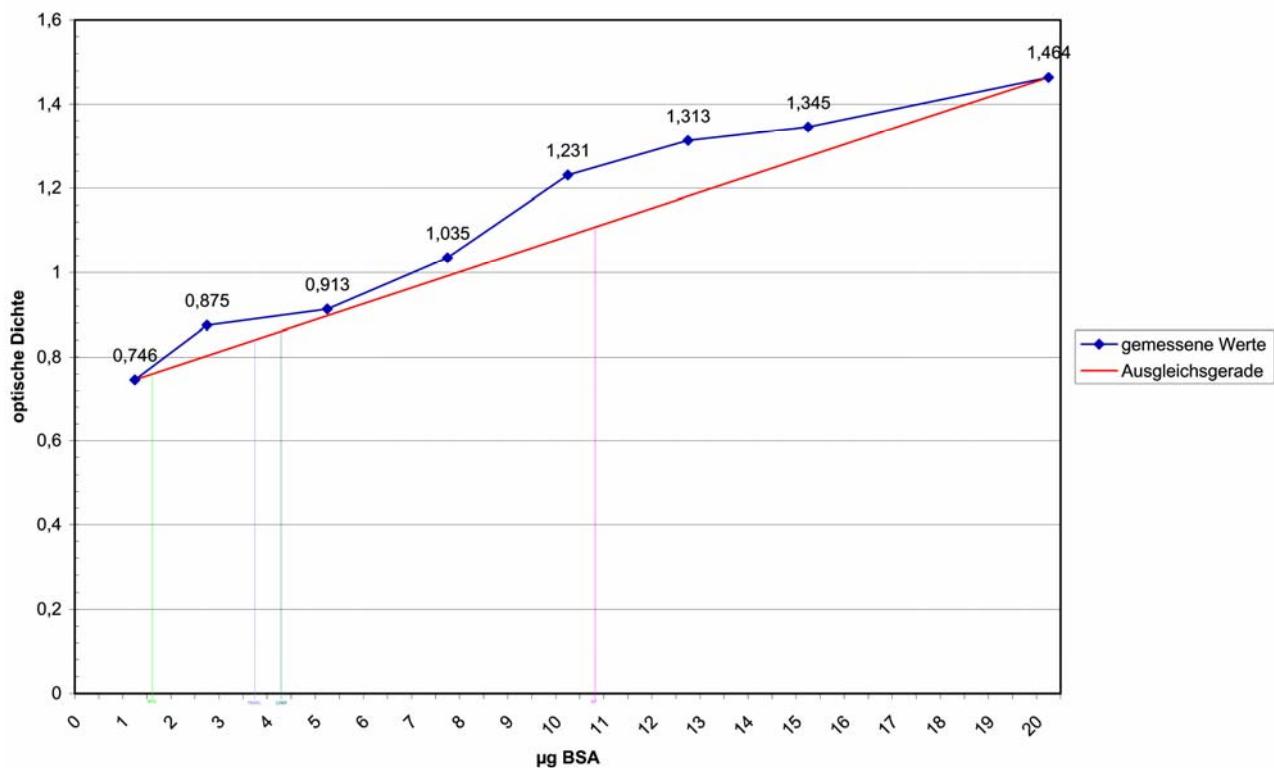
Des weiteren wurden für die Doppelbestimmung der unbekannten Probe zwei Eppendorfröhrchen mit je 3 µl Probe und 97 µl Wasser vorbereitet.

Die zuvor hergestellten Extrakte (Leber-, Muskel- und Hefeextrakt) wurden je 1:10 mit Wasser verdünnt (10 µl Extrakt und 90 µl Wasser) und davon je 2 µl für die quantitative Proteinanalyse eingesetzt.

Zu allen vorbereiteten Proben wurde anschließend 1 ml Bradford-Reagenz pipettiert und die Mischungen gut geschüttelt. Des weiteren wurden sie für ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, in Plastikküvetten überführt und bei 595 nm am Photometer vermessen. Die Messergebnisse stehen in Tabelle 5.

µg BSA	Optische Dichte
0	—
1	0,746
2,5	0,875
5	0,913
7,5	1,035
10	1,231
12,5	1,313
15	1,345
20	1,464
unbekannte Probe 1	0,901
unbekannte Probe 2	1,295
Durchschnittswert für die unbekannte Probe	1,098
Hefeextrakt	0,76
Leberextrakt	0,857
Muskelextrakt	0,835

Tabelle 5: Messergebnisse der Proteinanalyse-Proben am Photometer



Die grafische Auswertung ergab folgendes:

- Hefe: 1,6 µg Protein (hellgrün)
- Muskel: 3,7 µg Protein (blau)
- Leber: 4,3 µg Protein (türkis)
- unbekannte Probe: 10,8 µg Protein (violett)

Aus diesen Daten lässt sich nun die Konzentration berechnen, die in den unverdünnten Proben vorlag:

Es wurden jeweils 2 µl Probe für die Messung am Photometer verwendet. Diese Proben waren zuvor 1:10 verdünnt worden. Daraus ergaben sich folgende Werte:

Probe	µg Protein laut oD-Messung	Verdünnungsfaktor	ursprüngliche Konzentration
Hefe	1,6	1:10	8 g/l
Muskel	3,7	1:10	18,5 g/l
Leber	4,3	1:10	21,5 g/l
unbekannte Probe	10,8	-	10,8 g/l

Tabelle 6: Berechnung der ursprünglichen Proteinkonzentration in den Proben

### Fehleranalyse

Da die im vorherigen Versuch erhaltenen Messergebnisse sich stark auf das Photometer stützen, sind sie natürlich mit einem gewissen systematischen Fehler behaftet – sichtbar besonders an den beiden stark voneinander abweichenden oD-Werten der unbekannten Probe. Zu den systematischen Fehlern gesellen sich noch die zufälligen Fehler bei der Versuchsdurchführung, wie etwa falsche Pipettierung oder fehlerhafte Zusammensetzung der Proteinstandards. Ein weiteres Problem ist, dass unser Elektrophoresegel vor dem Fotografieren zum Teil zerrissen wurde und daher die Banden der Serum- und der Blutprobe, die oberhalb von ca. 90 kDa liegen, nicht zu erkennen sind.