

Stephanie [REDACTED]
BTA-OH
Gruppe A, Arbeitsplatz 5
Partner: Martin [REDACTED]

Versuch vom 28. und 29.11.2002

„Anreicherung von ADH aus Bäckerhefe“

Enzymisolierung durch Extraktion
und Anreicherung durch Aussalzen

Biochemisches Praktikum

Berufskolleg Kartäuserwall
Kartäuserwall 30, Köln

bei: Fr. Ulrike Schlicher

Extraktion von Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Saccharomyces cerevisiae und Anreicherung durch Ammoniumsulfat-Fällung

Theorie / Prinzip des Versuchs

In diesem Versuch wollen wir ein Enzym, nämlich die Alkoholdehydrogenase (ADH), aus der Bäckerhefe gewinnen und in einer möglichst geringen Lösung anreichern. Hierfür müssen wir mehrere uns bereits bekannte Methoden z.B. zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung sowie zur Ermittlung ihrer spezifischen Enzymaktivität anwenden (siehe alte Protokolle). Im Groben läuft der Versuch wie folgt ab:

1. Erstellen einer Proteineichkurve
2. Zellaufschluss der Zellen, die das Enzym enthalten
3. Erstellung eines Rohextraktes
4. fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung
5. nach jedem Fällungsschritt Ermittlung der Reinigungsparameter
 - a. Berechnen der Proteinmenge in der Fraktion
 - b. Berechnen der Enzymaktivität in der Fraktion

Aus diesen Daten lassen sich die spezifische Aktivität, die Ausbeute und der Reinheitsfaktor ermitteln, die uns Aufschluss geben über den Grad unserer Reinigung. Doch der Reihe nach: Was ist bei den einzelnen Versuchsschritten zu beachten?

1. Extraktionspuffer

Enzyme sind wie alle Proteine sehr empfindliche Moleküle. Ihre Konformation kann sehr leicht verloren gehen, wodurch das Enzym inaktiv wird. Wir wollen aber aktive Enzyme isolieren. Die erste wichtige Regel ist daher *zügiges Arbeiten*.

Wenn wir die Zellen aufschließen, werden die zelleigenen *Proteasen* freigesetzt, die sich z.B. in den Lysosomen befinden. Diese würden natürlich auch das Enzym angreifen, welches wir isolieren wollen. Daher müssen wir diese Proteasen hemmen. Dies machen wir zum einen durch eine Senkung der Temperatur. Wir arbeiten bei der Isolierung immer auf Eis, also bei *Temperaturen zwischen 0-4°C*. Weitere *Proteasehemmer* sind PMSF, welches Serinproteasen hemmt oder *EDTA*, welches Metalloproteasen hemmt. (siehe Extrablatt!)

Weiterhin sollte man den Kontakt mit Metallen vermeiden, also niemals mit einem Spatel die Enzymlösung rühren. Metallische Oberflächen können Schwermetalle an die Lösung abgeben. Diese *Schwermetalle hemmen* Enzyme meist *irreversibel*. Auch hier fügt man der Enzymlösung zur Risikominderung EDTA als Ionenfänger bei.

Der Kontakt mit Sauerstoff sollte auch minimiert werden, um eine Oxidation der Enzyme zu reduzieren. Die Lösung daher nicht wild schütteln oder umrühren. Mercaptoethanol dient häufig als *Antioxidationsmittel*. Es reagiert mit Luftsauerstoff und stellt so Sulfidbrücken zwischen Cysteinen her.

Mit diesen Informationen stelle ich dann einen Extraktionspuffer zusammen, in dem sich meine Enzyme wohlfühlen, also in dem sie aktiv bleiben. Zutaten sind also Schwermetall- und Ionenfänger, Antioxidationsmittel, der richtige *pH-Wert* und eine niedrige Temperatur.

2. Rohextrakt erstellen

Es gibt unterschiedliche Methoden des Zellaufschlusses: durch *Verreiben mit Aluminiumoxid*, durch Ultraschall oder durch einen Homogenisator. Der Aufschluss (in unserem Falle) der Hefezellen sollte sehr gründlich erfolgen. Der Puffer für die Extraktion sollte wie alle anderen Geräte und Lösungen auch schon gekühlt sein. Die Extraktionsmasse wird in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Im Überstand sollte

nun das gelöste Protein enthalten sein, im Pellet die Zelltrümmer. Dieser erste Überstand ist unser Rohextrakt.

3. Ammoniumsulfat-Fällung

Die Ammoniumsulfatfällung wird in der Regel als erster Grobreinigungs- und Konzentrationsschritt angewendet. Am sinnvollsten ist eine fraktionierte Fällung. Das bedeutet, dass die Konzentration des Salzes von Reinigungsschritt zu Reinigungsschritt vergrößert wird, bis alle Proteine ausgefällt wurden. Aber was bedeutet dieses Ausfällen? Beim Ausfällen von Proteinen werden diese denaturiert. Sie bilden Agglomerate und werden so schwerer als ihre Umgebung. Durch Zentrifugation können sie so im Pellet konzentriert werden. Manche Fällungen sind irreversibel, z.B. die durch Säuren oder durch Hitze. Es gibt aber auch reversible Fällungen, bei denen die Aktivität der Enzyme nicht verloren geht. Die gebräuchlichste Methode ist hier das „Aussalzen“ mit *Ammoniumsulfat* = $(NH_4)_2SO_4$. Dieses Salz ist selbst bis zu hohen Konzentrationen wasserlöslich. Durch das Salz wird den Proteinen die *Hydrathülle* entzogen, ohne dass es zu weiteren Veränderungen kommt. Die Proteinmoleküle binden aneinander und bilden ein Agglomerat, welches sich beim Abzentrifugieren im Pellet absetzt.

Durch die *fraktionierte Fällung* werden zuerst – also bei einer niedrigen Salzkonzentration – die Proteine gefällt, die eine geringe Affinität zum Wasser haben. Ihre Hydrathülle ist relativ dünn und für das Salz leicht angreifbar. Mit steigender Salzkonzentration werden nun Fraktion für Fraktion die Proteine nach wachsender Hydrathüllenstärke ausgefällt. So lassen sich die Proteine schon einmal grob auftrennen.

Die Menge an Ammoniumsulfat, die ich meiner Enzymlösung hinzufüge, lese ich aus einem sogenannten *Nomogramm* ab. Hier ist in einer Tabelle abgetragen, wie viel g/l ich einer x-%igen Lösung hinzufügen muss, um eine y-%ige Lösung zu erhalten.

4. Messergebnisse

Für die *Proteinbestimmung nach Bradford* muss ich die Extinktion meiner Proben bei 595 nm messen. Für die Berechnung der *Enzymaktivität* ermittle ich mittels photometrischer Messung die Anfangsgeschwindigkeit der Substratumsetzung meines Enzyms über eine Minute. Die Methoden hierzu haben wir ausführlich in den vorangegangenen Protokollen erläutert.

5. Reinigungsparameter

Der Erfolg unserer Arbeitsschritte wird durch 2 Parameter ermittelt: die Ausbeute in % und den Reinigungsfaktor. Die *Ausbeute* gibt Auskunft darüber, wie viel Protein während der Reinigungsschritte verloren geht. In *Rohextrakt sind 100%* enthalten. In jedem weiteren Reinigungsschritt geht etwas mehr Enzym verloren. Die Ausbeute gibt das Verhältnis des Enzyms zur Gesamtproteinmenge an. Die Fraktion, in der das Verhältnis vom Enzym zum Gesamtprotein am höchsten ist, enthält das gewünschte Enzym.

Der *Reinigungsfaktor* ergibt sich aus dem Vergleich der spezifischen Aktivität vor und nach einem Reinigungsschritt. Er gibt uns Auskunft darüber, ob wir das gewünschte Enzym wirklich gereinigt und angereichert haben, oder ob wir irgendetwas anderes in unserer Lösung haben.

Material

Untersuchungsmaterial: 20 g Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae* von ...

Geräte: Glasgeräte
Eis
Mörser und Pistill
Präzisionswaage 1500 von Faust

Analysenwaage und Messutensilien
 Eppendorfhütchen
 Mikropipette 0,5 - 5 ?l von Eppendorf
 Mikropipette 10 - 100 ?l von Eppendorf
 Mikropipette 100 -1000 ?l von Eppendorf
 Spitzen für Mikropipette
 Küvette nständer
 Plastikküvetten halbmilko, 1 ml von Plastibrand
 Spectrophotometer mit PC-Software von Pharmacia Biotech
 Suprafuge von Hearaeus Sepatech
 Winkelrotor 22,50 HFA
 Metallzentrifugenröhrchen

Chemikalien: Natriumdihydrogenphosphat NaH_2PO_4 , M: 137,99 g/mol von Merck
 EDTA, M: 372,24 g/mol, von Merck
 Di-Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, M: 132,14g/mol, reinst von Merck
 BSA, Rinderserum Albumin Fraktion V für biochemische Zwecke von Merck
 Coomassie brilliant blue G-250, M: 854,04 g/mol von Sigma
 Ethanol 96%, reinst, M: 46,07 g/mol, R11, S7-16 von Merck
 Phosphorsäure 85%, p.A., R34, S 26-36/37/39-45 von Merck
 NAD^+ ($\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_2$) von Merck, M: 663,44 g/mol
 Tetranatriumdiphosphat-Decahydrat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), M: 446,06 g/mol von Merck
 Ethanol 99%, p.A. von Merck, M:46,07 g/mol, $\delta=0,793 \text{ kg/l}$
 Natronlauge NaOH, 1 mol/l, $\delta: 1,05 \text{ g/cm}^3$ von Merck, R34, S 26-36/37/39-45

Durchführung

1. Ansetzen der Lösungen

1 l Extraktionspuffer	50 mM Na-Phosphatpuffer = 6,8995 g NaH_2PO_4 und 5 mM EDTA = 1,8612 g einwiegen und im Messkoben auf 1000 ml auffüllen (Extraktionspuffer = Ex-Puffer)
500 ml Bradford-Reagenz	50 mg Coomassie Brilliant Blue in 25 ml Ethanol lösen, 50 ml Phosphorsäure 85% dazugeben und mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, Reagenz filtrieren, (2 x herstellen)
100 ml Pyrophosphatpuffer	$M = 446,06 \text{ g/mol}$ $V = 100 \text{ ml} = 0,1 \text{ l}$ $c = 0,1 \text{ mol/l}$ $m = M \cdot V \cdot c$ $= 446,06 \text{ g/mol} \cdot 0,1 \text{ l} \cdot 0,1 \text{ mol/l}$ $= \mathbf{4,4606 \text{ g}}$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ auf 100 ml auffüllen, vorher mit NaOH pH 8,8 einstellen
1000 ml Ethanolösung	im Ansatz sollen 20 mM enthalten sein, der Anteil an EtOH-Lösung beträgt aber nur 1/3 des

Gesamtvolumens (1,2 ml zu 0,4 ml)
 die EtOH-Lösung muss also dreifach konzentriert
 angesetzt werden, da sie um diesen Satz
 verdünnt wird = 60 mM

$$M = 46,07$$

$$V = 1000 \text{ ml} = 1 \text{ l}$$

$$c = 60 \text{ mmol/l} = 0,06 \text{ mol/l}$$

$$\delta = 0,793 \text{ g/ml}$$

$$m_{\text{(EtOH)}} = M \cdot V \cdot c$$

$$= 46,07 \text{ g/mol} \cdot 1 \text{ l} \cdot 0,06 \text{ mol/l}$$

$$= 2,764 \text{ g EtOH in 1000 ml 60 mM Lösung}$$

$$V = m / d$$

$$= 2,76 \text{ g} / 0,793 \text{ g/ml}$$

$$= \mathbf{3,48 \text{ ml EtOH auf 1000 ml auffüllen}}$$

5 ml NAD⁺-Lösung
 (Coenzymlösung)

$$M = 663,44 \text{ g/mol}$$

$$V = 5 \text{ ml} = 0,005 \text{ l}$$

$$c = 50 \text{ mmol/l} = 0,05 \text{ mol/l}$$

$$m = M \cdot V \cdot c$$

$$= 663,44 \text{ g/mol} \cdot 0,005 \text{ l} \cdot 0,05 \text{ mol/l}$$

$$= \mathbf{0,1659 \text{ g NAD}^+ \text{ auf 5 ml mit Aqua dest. auffüllen}}$$

2. Erstellen einer Eichkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford

- Ansetzen der Stammlösung aus 10 mg BSA und 10 ml Extraktionspuffer, definierte Konzentration $c = 1 \text{ mg/ml}$
- Erstellen einer Verdünnungsreihe in Eppendorfhütchen:

700 μl Stammlösung + 300 μl Ex-Puffer
 600 μl Stammlösung + 400 μl Ex-Puffer
 500 μl Stammlösung + 500 μl Ex-Puffer
 u.s.w.
 0 μl Stammlösung + 1000 μl Ex-Puffer = Negativkontrolle

- Messansatz (in Doppelbestimmung): 20 μl Verdünnung
 1000 μl Coomassie
 50 μl 1-M NaOH
 Ansatz Eichgerade
- 5 Minuten warten
- Extinktion bei 595 nm messen
- erhaltene Daten mitteln
- in einer Eichkurve Extinktion gegen Konzentration auftragen
- Eichgerade erstellen
- Formel der Geraden anzeigen lassen

3. Zellaufschluss

- alle Geräte auf Eis lagern und benutzen
- 20 g Hefe und 2 Spatellöffel Aluminiumoxid mörsern, bis ein matschiger Brei entsteht
- die Masse mit wenig Ex-Puffer (30 ml) ausspülen und in ein

- Metallzentrifugenröhrchen überführen
- 10 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugieren
- der Überstand (supernatant = S) ist unser Rohextrakt
- er wird gemessen:
 - Volumen: mit einem Messzylinder wird das Volumen der Probe bestimmt
 - Proteinbestimmung: wir messen mit einer 1:10 Verdünnung; hierzu wird folgender Ansatz hergestellt:
 - 2 µl Probe
 - 18 µl Ex-Puffer
 - 50 µl 1-M NaOH
 - 1000 µl Coomassie Blue
 Ansatz Proteinbestimmung

bei 595 nm wird die Extinktion der Proben mit dem Photometer ermittelt

- Aktivitätstest: wir messen ebenfalls bei einer 1:10 Verdünnung; es wird folgender Ansatz hergestellt:
 - 4 µl Probe
 - 36 µl Ex-Puffer
 - 400 µl Pyrophosphatpuffer
 - 400 µl EtOH-Lösung
 - 320 µl Aqua dest.
 - 40 µl NAD₊-Lösung
 Ansatz Aktivitätstest

die Aktivität des Enzyms wird über die Umsetzung des Coenzym NAD⁺ zu NADH + H⁺ über 1 min bei 340 nm gemessen, die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion wird ermittelt; daraus wird die Aktivität berechnet

- aus Proteingehalt und Aktivität ermitteln wir die spezifische Aktivität des Enzyms in unseren Proben
- das Pellet (= P) kann verworfen werden
- diese Versuchsschritte lassen sich im Fließschema vereinfacht darstellen:

Fließschema 1. Versuchsteil

4. Ammoniumsulfatfällung

- die Ammoniumsulfatfällung erfolgt nach folgendem Fließschema:

Fließschema fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

- die Proteine sollen schrittweise ausgefällt werden
- hierzu wird die Ammoniumsulfatsättigung in der Proteinlösung schrittweise erhöht
- die Menge an Ammoniumsulfat, die man jeweils hinzugeben muss, erhält man aus einem Nomogramm zur Einstellung von Ammoniumsulfatkonzentrationen in %-Sättigung

Endkonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)

		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
		Zuzugebende Menge (g / L)																	
Anfangskonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767	
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
	50										33	66	101	137	176	214	302	392	
55											33	67	103	141	179	264	353		
60												34	69	105	143	227	314		
65													34	70	107	190	275		
70														35	72	153	237		
75															36	115	198		
80																77	157		
90																	79		

Tabelle 1: Nomogramm für % Ammoniumsulfatsättigung

- die Menge ist jeweils umzurechnen auf das jeweilige Probenvolumen, sie wird in g/l angegeben
- das Ammoniumsulfat wird gemörsert, damit es sich besser löst
- dann wird es unter vorsichtigem Rühren (nicht zu schnell – Denaturierung) auf Eis hinzugegeben
- abschließend wird 10 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert
- Überstand und Pellet werden gemessen
- solange im Überstand noch ADH zu messen ist, wird der Ablauf wiederholt

Ergebnisse

Bei der Messung des Proteingehalts der BSA-Stammlösung erhielten wir folgende Daten:

Küvette Nr.	Extinktion				Massenkonz. [mg/ml]
	1. Messreihe	2. Messreihe	3. Messreihe	Durchschnitt	
1	0,693	0,612	0,644	0,650	0,7
2	0,645	0,360	0,587	0,531	0,6
3	0,569	0,490	0,510	0,523	0,5
4	0,478	0,527	0,449	0,485	0,4
5	0,365	0,394	0,339	0,366	0,3
6	0,294	0,281	0,242	0,272	0,2
7	0,178	0,118	0,084	0,127	0,1
8	set ref	set ref	set ref	set ref	0

Tabelle 2: Erstellen der Protein-Eichgerade

Für die einzelnen Fällungen haben jeweils soviel Ammoniumsulfat benötigt:

40% Fällung

33ml Rohextrakt = 0% Sättigung
↓
40% Sättigung

benötigt: 243 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 1000 \text{ ml}$
 $x \text{ g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 33 \text{ ml}$

$x = (243 \text{ g} / 1000 \text{ ml}) * 33 \text{ ml}$
 $x = \mathbf{8,019 \text{ g}}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ für eine 40% Lösung

60% Fällung

36ml S1 = 40% Sättigung
↓
60% Sättigung

benötigt: 132 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 1000 \text{ ml}$
 $x \text{ g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 36 \text{ ml}$

$x = (132 \text{ g} / 1000 \text{ ml}) * 36 \text{ ml}$
 $x = \mathbf{4,752 \text{ g}}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ für eine 60% Lösung

80% Fällung

37ml S2 = 60% Sättigung
↓
80% Sättigung

benötigt: 143 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 1000 \text{ ml}$
 $x \text{ g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow 37 \text{ ml}$

$x = (143 \text{ g} / 1000 \text{ ml}) * 37 \text{ ml}$
 $x = \mathbf{5,291 \text{ g}}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ für eine 80% Lösung

Die Proben waren nach dem Zentrifugieren nicht wirklich klar. Daher haben wir sie auch für alle Messungen 1:10 verdünnt. Wir hatten nach jeder Zentrifugation ein gut sichtbares Pellet, welches sich resuspendieren ließ.

Beim Messen der verschiedenen Reinigungsschritte haben wir diese Daten ermittelt:

Probe	Volumen [ml]	Extinktion [E]	Durchschnitt	Slope [E/min]	Durchschnitt
Rohextrakt	33,0	0,296	0,276	0,450	0,405
		0,255		0,360	
S1	36,0	0,275	0,299	0,450	0,359
		0,322		0,267	
P1	5,0	0,328	0,330	0,060	0,060
		0,331		0,060	
S2	37,0	0,094	0,102	0,030	0,030
		0,110		0,030	
P2	6,6	0,571	0,541	1,267	1,038
		0,510		0,808	
S3	39,0	0,047	0,064	0,030	0,051
		0,080		0,072	
P3	2,4	0,194	0,206	0,132	0,156
		0,217		0,180	

Tabelle 3: Messergebnisse der Reinigungsschritte

Auswertung

Aus den mit der BSA-Stammlösung ermittelten Daten erstelle ich eine Eichgerade, aus der ich dann im späteren Verlauf des Versuchs den Proteingehalt der einzelnen Proben ermitteln kann. Hierzu stelle ich die Gradengleichung der Eichgeraden nach x um und setze die von mir gemessene Extinktion für y ein:

$$Y = 0,8855 x + 0,0592 \quad \rightarrow \quad x = y - 0,0592 / 0,8855$$

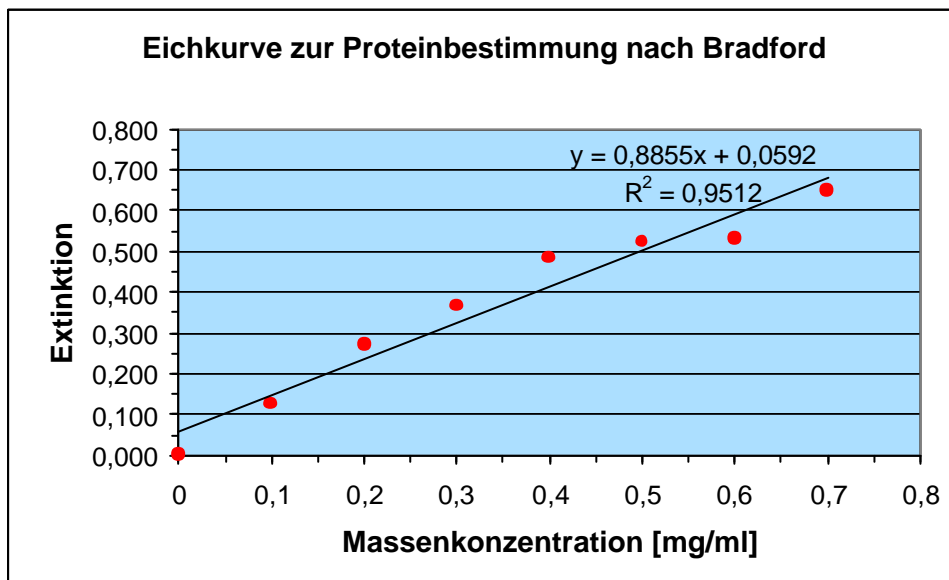


Diagramm 1

Da ich so die Proteinmenge in 1 ml berechne, muss ich das Ergebnis nun nur noch mit dem vorher ermittelten Gesamtvolumen der Probe multiplizieren. Außerdem muss ich mit dem Faktor 10 multiplizieren, da ich ja eine Verdünnung von 1:10 gemessen habe. Exemplarisch am Beispiel des Rohextraktes sieht das dann so aus:

$$x = (((0,276 - 0,0592)/0,8855) * 33) * 10$$

$$x = \mathbf{80,8 \text{ mg}}$$
 Protein in 33 ml Probe

Um die Enzymaktivität der Probe zu berechnen, stelle ich das Lambert-Beer'sche Gesetz um und ermittle die umgesetzte Substratmenge (NAD⁺). Auch hier rechne ich die Ergebnisse wieder auf das Gesamtvolumen der Probe hoch und multipliziere mit dem Faktor 10. Exemplarisch am Beispiel der Daten des Rohextraktes sieht das dann so aus:

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

$$d = 1 \text{ cm}$$

$$v_0 = 0,405 = \Delta E \text{ (Slope)}$$

$$\epsilon_{\text{NADH}_2} = 6,3 \text{ l}/(\text{mmol} * \text{cm})$$

$$\Delta c = v_0 / (\epsilon * d)$$

$$= 0,405 / [6,3 \text{ l}/(\text{mmol} * \text{cm}) * 1 \text{ cm}]$$

$$= 0,0643 \text{ mmol/l} = 64,3 \text{ } \mu\text{mol/l}$$

$$64,3 \text{ } \mu\text{mol} \quad \rightarrow \quad 1000 \text{ ml}$$

$$x \text{ } \mu\text{mol} \quad \rightarrow \quad 33 \text{ ml}$$

$$x = 2,122 \text{ } \mu\text{mol} * 10$$

$$= 21,22 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}$$

$$= \mathbf{21,22 \text{ U}}$$
 in 33 ml Rohextrakt

Aus der Aktivität und der Proteinmenge kann ich nun die spezifische Aktivität meiner Probe berechnen. Hierzu rechne ich einfach über Dreisatz um, wie hoch die Aktivität bezogen auf ein mg Protein ist:

- im Rohextrakt sind in 33 ml 80,8 mg Protein gelöst
- diese 80,8 mg haben eine Aktivität von 21,22 U
- ein mg Protein hat demnach eine spezifische Aktivität von **0,263 U/mg**

Zusammengefasst sind wir zu folgenden Ergebnissen gekommen:

Fraktion	Volumen [ml]	Protein [mg]	Aktivität [U]	Ausbeute [%]	spez. Aktivität [U/mg]	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	33,0	80,609	21,214	100,0	0,263	1,0
S1	36,0	97,287	20,486	96,6	0,211	0,8
P1	5,0	15,263	0,476	2,2	0,031	0,1
S2	37,0	17,884	1,762	8,3	0,099	0,4
P2	6,6	35,873	10,869	51,2	0,303	1,2
S3	39,0	1,894	3,157	14,9	1,667	6,3
P3	2,4	3,965	0,594	2,8	0,150	0,6

Tabelle 4: Reinigungstabelle für ADH

Für einen weiteren Reinigungsschritt würde ich die Probe mit der höchsten Ausbeute nach der zweiten Fällung wählen. Nach der 40% - Fällung sind noch fast alle Proteine im Überstand enthalten (96,6%). Wir wollen unser Enzym jedoch im Pellet konzentriert erhalten. Nach der 60% - Fällung haben wir eine Ausbeute von 51,2 % im Pellet. Es sind zwar schon viele Proteine verloren gegangen. Aber in diesem Pellet ist eindeutig viel Enzym enthalten. Der Reinigungsfaktor dieser Probe beträgt 1,2. Da ich keine Literaturwerte gefunden habe kann ich nicht beurteilen, ob dieser Wert gut oder schlecht ist.

Die Ammoniumsulfatfällung hat im Vergleich zur Fällung mit PEG die besseren Ergebnisse geliefert. Bei der PEG-Fällung entstand nach keinem der Reinigungsschritte ein Pellet. Es war also praktisch kein Protein mehr vorhanden – oder alle Proteine schwammen einfach weiter in der Lösung. Unsere Pellets hingegen waren gut sichtbar und bereits während der Fällung konnte man die deutliche Trübung bei der 60%-Fällung erkennen.

Fehlerdiskussion

Der Versuch lief eigentlich ziemlich glatt. Unsere Eichgerade war in Ordnung und wir konnten die Proteinmenge ohne Probleme berechnen. Nach der ersten Zentrifugation war unser Rohextrakt jedoch sehr trüb – wir hatten mehr Aluminiumoxid zum Mörsern benutzt als die anderen. Im weiteren Versuch konnten wir diese Trübung aber durch Verdünnung umgehen. Unsere Extinktionen und Slopes waren okay.