

KFK-224

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE

Juni 1964

KFK 224

Schule für Kerntechnik

Gesellschaft für Kerntechnik Karlsruhe
Zentralbücherei
14. Dez. 1964

Praktikumsversuche über Anwendung von Radioisotopen in der Biochemie

Wolfgang Hülsen, Regina Scharf



GESELLSCHAFT FÜR KERNFORSCHUNG M. B. H.
KARLSRUHE

Juni 1964

KFK 224

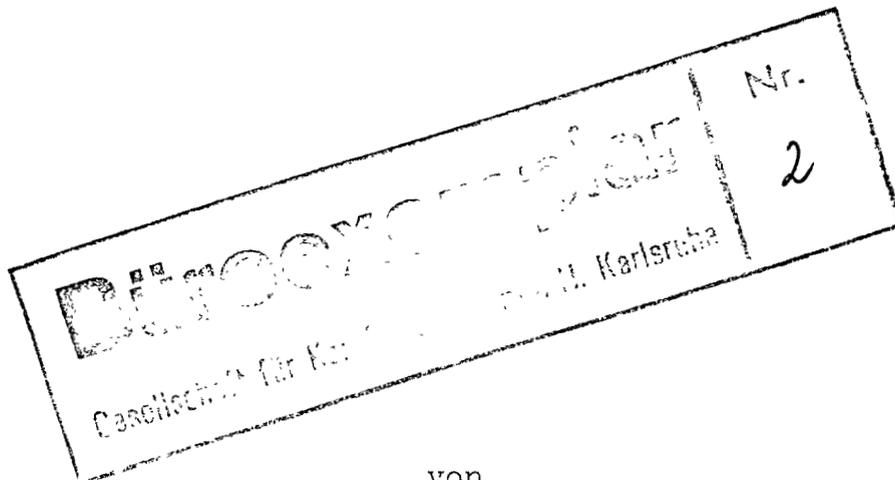
Schule für Kerntechnik

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H.
Zentralbücherei

Praktikumsversuche

über

Anwendung von Radioisotopen in der Biochemie



von

Wolfgang Hülsen

und

Regina Scharf

Gesellschaft für Kernforschung m.b.H.
Karlsruhe

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
Vorwort	1
Einleitung	3
Praktikumsversuche	5
1. Markierungsverfahren	5
1.1 Markierung von Bengalrosa mit J-131	9
1.2 Markierung von Insulin mit J-131	14
1.3 Markierung von Nucleotiden mit P-32	19
1.4 Markierung von Metaboliten mit C-14	24
2. Nachweis radioaktiver Abbauprodukte markierter Proteine	28
3. Untersuchung eines biochemischen Vorgangs mit Hilfe einer C-14-markierten Substanz	34
4. Verteilung und Dekorporation von Ce-144	38

Vorwort

Im folgenden sind einige der Versuche zusammengestellt, die im biochemischen Praktikumskurs der Schule für Kerntechnik regelmäßig durchgeführt werden. Dieser Kurs ist eine Ergänzung zum Radioisotopen-Grundkurs und soll dem Teilnehmer durch Vorlesungen, hauptsächlich aber durch eigene Arbeit im Laboratorium Kenntnisse vermitteln, die ihm gestatten, zu beurteilen, ob und wie weit die Anwendung von Isotopen in seinem eigenen Arbeitsgebiet vorteilhaft ist.

Die Praktika sind also nicht etwa optimale Verfahren für spezielle Untersuchungen, sondern behandeln die wichtigsten Anwendungsgebiete für Isotope derart, daß das Typische gut zu erkennen ist und daß sich die Arbeitsvorschrift für den eigenen Bedarf leicht abwandeln läßt.

So handelt es sich zum Beispiel bei dem Praktikum über Jodmarkierung des Insulins durch Synthese nur darum, die Methodik zu demonstrieren. Die spezifische Aktivität des vom Kursteilnehmer markierten Insulins ist viel zu klein, um im biochemischen Versuch eingesetzt zu werden. Selbstverständlich läßt sich die spezifische Aktivität ausreichend steigern, wenn die in der Arbeitsvorschrift angegebene Menge Trägerjod entsprechend verringert wird. Das ist sogar unerläßlich, denn nach FRAENKEL-CONRAT (1) nimmt mit zunehmender Jodierung des Insulins die biologische Wirkung des Hormons ab. Die Verwendung markierten Insulins als "Tracer" wird also illusorisch, wenn die notwendige Aktivität nur durch vollständige Jodierung des Hormons erreicht werden kann. Bevor markiertes Insulin als "Tracer" im biologischen Versuch eingesetzt wird, muß es besonders gereinigt werden.

(1) J. Fraenkel-Conrat und H. Fraenkel-Conrat: Biochem. Biophys. Acta, 5: 89 (1950)

Erstens durch Dialyse, um adsorbiertes Jod und Jodid zu entfernen und zweitens durch Gel-Filtration nach BANERJEE (2), wobei biologisch aktives Insulin von inaktivem getrennt wird. Es bleibt offen, ob die von FRAENKEL-CONRAT (3) beobachtete Inaktivierung nur auf die Jodierung der Tyrosinreste zurückzuführen ist oder auch auf die Wirkung der Oxydationsmittel, die für die Jodierung nötig sind.

Diese Betrachtungen dienen nur dazu, an einem Beispiel zu zeigen, daß sich der Kursteilnehmer eingehend in der entsprechenden Literatur informieren muß, bevor er eine Praktikumsvorschrift für eigene Arbeiten anwenden kann.

Aufgrund der Erfahrungen, die bei der Durchführung des biochemischen Praktikumsurses gemacht wurden, sind in der vorliegenden Zusammenstellung allgemein interessierende Anwendungsgebiete behandelt worden. Praktika über C-14- und H-3-Messung in der Gasphase oder mit Flüssigszintillatoren und Massenspektrometrie stabiler Isotope wurden bewußt nicht aufgenommen, weil bei ihnen die Meßtechnik im Vordergrund steht und nicht die Anwendung von Radioisotopen.

Herrn Prof. Dr. W. Seelmann-Eggebert verdanken wir wertvolle Hinweise bei der Abfassung des Manuskripts.

Herr F.-J. Gerds war bei der Bearbeitung einiger Praktika beteiligt.

(2) R.N. Banerjee und K. Gibson: J. Endocrinology, 25:
145 (1962)

(3) loc. cit. (1)

Einleitung

Ein Ziel der biochemischen Forschung ist die Aufklärung der Reaktionsmechanismen der im menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Organismus ablaufenden chemischen Prozesse. Grundsätzlich wird alles vom Organismus Aufgenommene oder Aufgebaute nach einiger Zeit wieder abgebaut und ausgeschieden. Zwischen der Aufnahme und der Ausscheidung vollzieht sich der Stoffwechsel. Dieser dynamische Zustand, in dem sich der lebende Organismus befindet, ist u.a. dadurch gekennzeichnet, daß kein Molekül während längerer Zeit in derselben Umgebung verweilt und daß viele Molekülarten bis zu Atomgruppen oder sogar bis zu Atomen abgebaut werden, die der Organismus dann zum Aufbau anderer Moleküle verwendet.

Um den Ablauf der metabolischen Vorgänge verfolgen zu können, ist die Anwendung radioaktiv markierter Moleküle meist unumgänglich. Da durch geeignete Markierung die biochemischen Eigenschaften der Substanz in keiner Weise verändert werden, lassen sich die in den Organismus eintretenden Moleküle von den gleichen, die schon im Organismus vorhanden sind, unterscheiden. Aufgrund ihrer Strahlung können die markierten Substanzen zu jeder Zeit und an jedem Ort nachgewiesen werden, ohne den Ablauf des zu untersuchenden metabolischen Vorgangs zu stören.

Es ist also durch die Tracermethode möglich, den Weg einer Molekülart durch den Organismus zu verfolgen und eventuelle Veränderungen, denen sie unterworfen ist, festzustellen. Auch werden kinetische Untersuchungen derjenigen Reaktionen möglich, an denen das markierte Molekül beteiligt ist.

Außer diesen Anwendungsmöglichkeiten können radioaktive Isotope als Indikatoren in verschiedenen biochemischen Analysemethoden verwendet werden, um deren Aussagen zu verbessern;

sei es in Bezug auf die untere Nachweisgrenze einer Substanz, sei es im Hinblick auf die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung. Unter Umständen kann durch Verwendung eines radioaktiven Indikators der gesamte Analysengang vereinfacht werden.

Im folgenden sind einige typische, praktische Beispiele zur Verwendung von Radioisotopen in der Biochemie zusammengestellt.

Praktikumsversuche

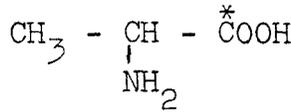
1. Markierungsverfahren

Es lassen sich 4 grundlegende Markierungsarten mit Radionukliden unterscheiden:

1. Uniforme Markierung (in der Literatur sind derart markierte Verbindungen mit "U" gekennzeichnet.)
Hierbei ist z.B. die C-14-Aktivität statistisch gleichmäßig auf sämtliche C-Atome verteilt.

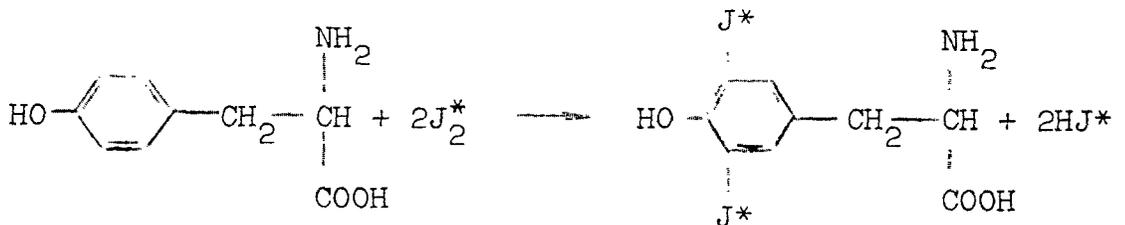
2. Generelle Markierung (Kennzeichen: "G")
Das bedeutet, z.B. bei Tritiummarkierung, daß zwar alle gleichen Atome markiert sind, die Aktivität aber nicht statistisch gleichmäßig verteilt sein muß.

3. Spezifische Markierung (gekennzeichnet durch Positionsangabe, z.B.: Alanin-1-C-14)
In diesem Fall sind nicht alle gleichen Atome einer Verbindung markiert, z.B.:

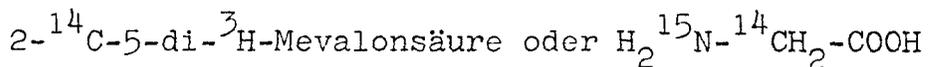


4. Fremdmarkierung

Durch Synthese ist ein molekülfremdes Radionuklid eingeführt worden, z.B.:



Diese Markierungsarten oder ihre Kombinationen sind auch bei Doppelmarkierung anzutreffen. Doppelmarkierung bedeutet, daß in dieselbe Molekülart Isotope verschiedener Elemente eingeführt werden, z.B.:



Von Doppelmarkierung spricht man aber auch, wenn eine Molekülart mit verschiedenen Isotopen des gleichen Elements markiert ist, z.B. mit dem stabilen Isotop C-13 und dem radioaktiven C-14.

Bei Verwendung stabiler Isotope sind zum Nachweis Massenspektrometer erforderlich.

Die Verfahren, die man zur Markierung benutzt, lassen sich in 3 Gruppen einteilen.

1. Markierung durch Isotopenaustausch,
2. Markierung durch Synthese,
3. Markierung durch Biosynthese.

Ein Isotopenaustausch läßt sich, falls er überhaupt möglich ist, fast immer mit einfachen Mitteln und guter Ausbeute durchführen. Das zeigt sich bei der am häufigsten angewandten Methode der Tritiummarkierung nach WILZBACH (1,2)

Umständlich und oft auch kostspielig ist dagegen die Markierung durch Synthese, weshalb sie meistens nicht im eigenen Laboratorium durchgeführt wird. Die Probleme der klassischen, also inaktiven Synthese: viele Schritte und schlechte Ausbeute bestehen ja genauso und oft in verstärktem Maße für Synthesen mit aktivem Material. Zusätzliche Schwierigkeiten treten dadurch auf, daß sich die eingesetzte Aktivität auch auf die Nebenprodukte verteilt, was eine verminderte spezifische Aktivität des Endproduktes zur Folge hat. Hohe Anfangsaktivitäten und komplizierte Reinigungsverfahren sind also nötig, um eine gewünschte Menge Endprodukt mit geeigneter spezifischer Aktivität zu erhalten.

Ähnliche Schwierigkeiten treten auf, wenn im eigenen Laboratorium eine markierte Verbindung durch Biosynthese hergestellt

(1) K.E. Wilzbach: J. am. chem. Soc., 79 : 1013 (1957)

(2) M. Wenzel und P.E. Schulze: "Tritium-Markierung"

W. de Gruyter u. Co. Berlin 1962

werden soll. Die Synthese wird zwar von lebenden Organismen (meist Einzellern) vollzogen, aber beim Aufarbeiten des Kulturmediums und den Schritten zur Reindarstellung der gewünschten Verbindung ist mit - oft großen - Verlusten zu rechnen. Ist das Laboratorium nicht auf derartige Arbeiten spezialisiert, dann kann die Ausbeute unter ein vertretbares Minimum sinken.*

Allgemein ist zu sagen, daß die Verwendung von markierten Verbindungen vor allem dann gerechtfertigt ist, wenn durch die Markierung der Nachweis oder die quantitative Bestimmung der Substanz überhaupt erst möglich wird oder einfacher, schneller und genauer ausgeführt werden kann, als es mit anderen Methoden möglich ist.

Die Art der Markierung (uniform, spezifisch, usw.) hängt häufig von dem Problem ab, das mit Hilfe der markierten Substanz bearbeitet werden soll.

Zum Beispiel verwendet man eine spezifisch markierte Verbindung immer dann, wenn Reaktionen zu untersuchen sind, an denen die markierte Atomgruppe teilnimmt. So wird bei der Untersuchung einer Transmethylierung eine in der Methylgruppe spezifisch markierte Verbindung eingesetzt werden.

Die Verwendung doppelt markierter Verbindungen ist angezeigt, wenn vermutet wird, daß bestimmte Teile eines Moleküls an verschiedenen Reaktionsketten beteiligt sind.

Eine Sonderstellung nimmt die Fremdmarkierung ein. Ihre Anwendung wird selten durch das zu untersuchende Problem bestimmt, sondern ist meistens ein Notbehelf, wenn sich keine andere Markierung durchführen läßt. Ihre Brauchbarkeit wird eingeschränkt durch das Risiko, schwer feststellen zu können, welchen Einfluß das Fremdatom auf den Reaktionsablauf hat.

Schließlich ist bei Benutzung markierter Substanzen für metabolische Untersuchungen zu beachten, daß durch ihren Ab- bzw. Umbau Aktivität an sehr verschiedenen Stellen des Organismus auftauchen und zeitweilig gespeichert werden kann. Es emp-

*Über "Markierung durch enzymatische Umsetzungen" siehe:

Th. Günther und M. Wenzel: Z.physiol.Chem., 335: 63 (1963)

zieht sich folglich, ein "Tracer"-Experiment erst auszuwerten, wenn der Verbleib der ursprünglich zugeführten Aktivitätsmenge völlig klar ist, d.h. wenn eine Aktivitätsbilanz aufgestellt worden ist.

1.1 Markierung von Bengalrosa mit J-131

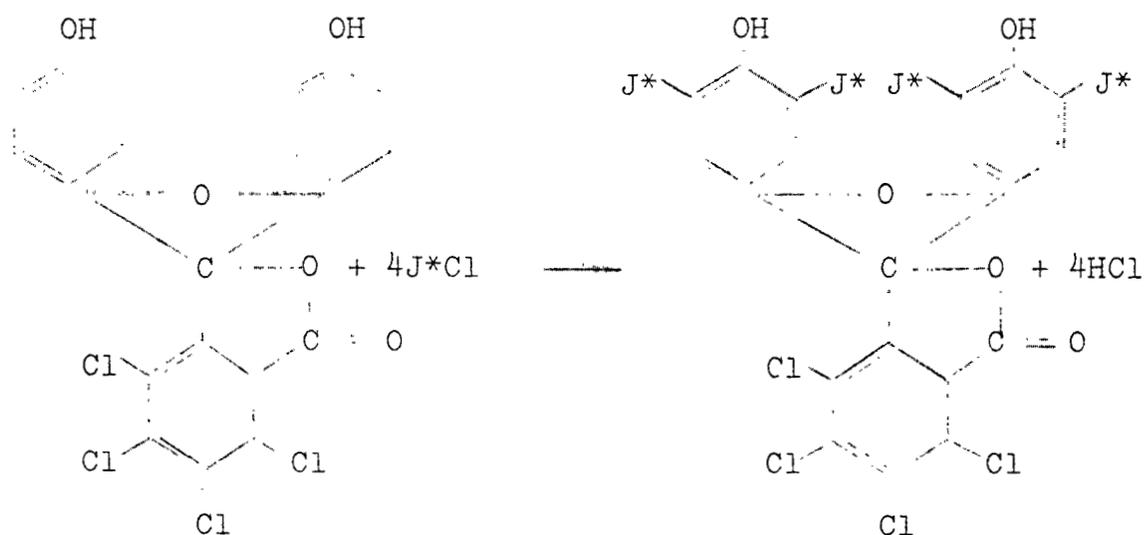
Die Markierung von Bengalrosa ist leicht durchführbar und instruktiv, da zwei für die Markierungsmethodik typische Verfahren nacheinander angewandt werden. Zuerst wird durch Isotopenaustausch ein Reagenz markiert, danach wird dieses markierte Reagenz zur Teilsynthese verwendet.

Aufgabenstellung

1. Der Farbstoff Bengalrosa (3'-4'-5'-6'-Tetrachlor-2-4-5-7-tetrajodfluorescein) ist durch Teilsynthese mit J-131 zu markieren.
2. Die Markierungsausbeute, die chemische Ausbeute und die spezifische Aktivität des Farbstoffs sind zu bestimmen.

Versuchsbeschreibung

1. Markierung von Jodmonochlorid mit J-131 durch Isotopenaustausch.
2. Jodierung einer Vorstufe des Farbstoffs mit dem markierten Jodmonochlorid (synthetischer Schritt).



Zur Markierung von Jodmonochlorid wird eine methanolische Lösung von JCl mit einer trägerfreien J-131-Lösung versetzt. Das Austauschgleichgewicht stellt sich in wenigen Minuten ein.

Zur Jodierung werden die methanolischen Lösungen von Jodmonochlorid und 3'-4'-5'-6'-Tetrachlorfluorescein (TCF) zusammengegossen und unter Rückfluß gekocht. Nach Abdestillieren des Methanols wird der zurückbleibende Farbstoff Bengalrosa (TCTJF) gewaschen, gelöst und seine Aktivität gemessen. Aus dieser Lösung läßt sich der Farbstoff fällen und die chemische Ausbeute durch Wägung bestimmen.

Materialien

J-131-Lösung (1 μ Ci/0,1 ml)
1 Meßpipette (1 ml) für die Jodaktivität
Tetrachlorfluoresceinlösung (0,94g/50 ml 0,1 n NaOH)
Jodmonochloridlösung (1,94g/50 ml Methanol)
Methanol p.a.
HCl (1 n)
HCl (0,01 n)
NaOH (1 n)
Natriumbisulfitlösung (NaHSO_3), (1 n)
2 Meßpipetten (5 ml)
1 Meßzylinder (10 ml)
2 Zentrifugengläser (15 ml)
2 Reagenzgläser
1 Rundkolben mit Schliff (50 ml)
1 Rückflußkühler (20 cm)
1 Destillationsaufsatz
1 Schliffthermometer
Siedesteinchen

Ausführung

1. In einem Reagenzglas werden 0,1 ml J-131-Lösung mit 2 ml Methanol und 2 ml Jodmonochloridlösung gut gemischt.

2. Aus 2,5 ml der Tetrachlorfluorescein-Lösung fällt man den Farbstoff in einem Zentrifugenglas mit wenig 1 n HCl (0,2 - 0,3 ml) und zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird so vollständig wie möglich entfernt und verworfen.
3. Der Niederschlag wird mit 5 ml Wasser aufgeschlämmt und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und verworfen. (Dieses Waschen ist notwendig, da Spuren von Salzsäure das Lösen des Niederschlags in Methanol erschweren.)
4. Der Niederschlag wird in wenig Methanol gelöst, wenn nötig unter gelindem Erwärmen, und in das 50 ml Schliffkölbchen überführt (insgesamt 5 ml Methanol). Nachdem das Kölbchen mit der methanolischen Farbstofflösung abgekühlt ist, versetzt man mit der markierten Jodmonochloridlösung, gibt ein Siedesteinchen dazu und kocht auf dem Wasserbad eine Stunde lang unter Rückfluß.
5. Dann wird abgekühlt und mit 5 Tropfen Natriumbisulfitlösung versetzt, um den Überschuß an Jodmonochlorid zu zerstören. Etwa ausgeschiedener Farbstoff kann mit einigen Tropfen 1 n NaOH in Lösung gebracht werden.
6. Ein neues Siedesteinchen wird zugegeben und das Methanol abdestilliert.
7. Zur Reinigung überführt man die Farbstofflösung mit 2-3 ml Wasser in ein Zentrifugenglas, fällt den Farbstoff mit wenig 1 n HCl aus und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird in einen Meßzylinder dekantiert, mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und im Flüssigkeitszählrohr ihre Aktivität (R_1) gemessen.
8. Der Niederschlag wird 3 mal mit 1 ml 0,01 n HCl gewaschen, jedesmal abzentrifugiert und das Waschwasser gesammelt.
9. Den so gewaschenen Farbstoff löst man nochmals in einigen Tropfen 1 n NaOH und wiederholt das Fällen mit 1 n HCl sowie das Waschen mit 0,01 n HCl wie oben beschrieben.

Zuletzt soll noch mit etwas Wasser gewaschen werden. Die Aktivität (R_2) der gesamten Waschwässer, deren Menge 10 ml nicht übersteigen darf, wird gemessen.

10. Schließlich löst man den abzentrifugierten Farbstoff in einigen Tropfen 1 n NaOH, füllt mit Wasser auf 10 ml auf und mißt die Aktivität (R_3) der Farbstofflösung.
11. Die Farbstofflösung wird aus dem Flüssigkeitszählrohr quantitativ in ein ausgewogenes Zentrifugenglas überführt und der Farbstoff mit 1 n HCl gefällt. Nachdem man den Niederschlag abzentrifugiert hat, wird die überstehende Lösung entfernt und verworfen. Der Niederschlag wird im Vakuum getrocknet und gewogen.

Auswertung

1. Die Ausbeute M (in %) der Farbstoffmarkierung errechnet sich aus:

$$M(\%) = \frac{R_3 \cdot 100}{G}$$

$$G = R_1 + R_2 + R_3 \quad (R = \text{Nutzrate})$$

2. Die chemische Ausbeute C (in %) wird wie folgt ermittelt:

$$\text{Theoretische Ausbeute (mg)} = \frac{\text{Einwaage}_{\text{TCF}} \cdot \text{Mol.-Gew.}_{\text{TCTJF}}}{\text{Mol.-Gew.}_{\text{TCF}}}$$

$$C(\%) = \frac{\text{Auswaage}_{\text{TCTJF}} \cdot 100}{\text{theoretische Ausbeute}}$$

Hierin ist: TCF = Tetrachlorfluorescein
TCTJF = Tetrachlor-tetraiodfluorescein
Mol.-Gew. = Molekulargewicht

3. Die spezifische Aktivität des markierten Farbstoffes ist:

$$\text{spez. Akt. } (\mu\text{Ci/mg}) = \frac{R_3 \cdot 10^2}{\eta \cdot 2,22 \cdot 10^6 \cdot \text{Auswaage}_{\text{TCTJF}}}$$

Hierin ist η = Wirkungsgrad der Meßanordnung für J-131

Literatur

- R. Moreau, H. Renault und A. Lemonnier: Bull. Soc. Chim.
France, Ser. 5,
Vol. 25: 1535 (1958)
- J. Liebster und O. Andrysek: Nature, 184: 913 (1959)

1.2 Markierung von Insulin mit J-131

Die Markierung von Insulin mit J-131 ist eine Fremdmarkierung, die auf synthetischem Weg erreicht werden kann. Das Protein Insulin enthält 12 % Tyrosin. Diese Aminosäure läßt sich auch dann jodieren, wenn sie sich im Peptidverband befindet. Wird die Jodierung unter milden Bedingungen und mit wenig Trägerjod durchgeführt, so bleibt die Hormonwirkung erhalten. Das markierte Jod besetzt die ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe des Tyrosins.

Aufgabenstellung

1. Insulin* soll nach vier verschiedenen Arbeitsvorschriften mit J-131 markiert werden.
2. Die spezifische Aktivität des Jodinsulins ist zu bestimmen.

Versuchsbeschreibung

In 4 Ansätzen wird J-131-Lösung, jedesmal mit einem anderen Träger, zur Insulinlösung gegeben.

1. Ansatz: elementares Jod in Kaliumjodid-Lösung gelöst.
2. Ansatz: elementares Jod in Alkohol gelöst.
3. Ansatz: naszierendes Jod aus Kaliumjodid, Kaliumjodat und Säure.
4. Ansatz: Jodmonochlorid.

Das Insulin wird aus jedem Ansatz mindestens zweimal isoelektrisch gefällt, wodurch der größte Teil des vorhandenen, nicht angelagerten Jods vom Protein getrennt wird. Das gefällte Protein wird abzentrifugiert, wieder gelöst und die Aktivität der Proteinlösung im Flüssigkeitszählrohr gemessen.

Materialien

- J-131-Lösung (17 μ Ci/8,5 ml)
- 1 Pipette (2 ml) für Jod-Aktivität
- 1 Kolbenpipette (5 ml)

* kristallisiertes Insulin der "Farbwerke Hoechst AG"

Jod-Kaliumjodid-Lösung (16,7 mg KJ + 12,7 mg Jod/ml)
Kaliumjodid-Lösung (7 mg KJ/ml)
Kaliumjodat-Lösung (1,8 mg KJO_3 /ml)
Salzsäure (1 n)
Jod-Alkohol-Lösung (12,7 mg Jod/ml 96 %igem Alkohol)
Jodmonochlorid-Lösung (8,2 mg JCl /ml Methanol) frisch angesetzt
Insulin-Lösung (10 mg kristallisiertes Insulin/ml 0,05 n HCl)
HCl (0,05 n)
Citratpuffer (0,5 m, pH 5,5)
Phosphatpuffer (0,2 m, mit NaOH pH 8,4 eingestellt)
KJ-Lösung (2 n)
4 Zentrifugengläser (50 ml) mit 3 Gummistopfen
Eisbad

Ausführung

Zur Bestimmung der volumen-spezifischen Nutzrate der J-131-Lösung werden 0,5 ml auf 10 ml verdünnt (1 μCi /10 ml) und im GM-Flüssigkeitszählrohr gemessen (S/4).

1. Ansatz:

1. 2 ml Insulinlösung, 2 ml Jod-131-Lösung (2 μCi /ml), 2 ml Wasser und 0,5 ml Jod-Kaliumjodid-Lösung werden in ein Zentrifugenglas gegeben; man verschließt das Glas mit einem Gummistopfen und stellt es 20 min in ein Wasserbad (40°C).
2. Anschließend wird das Glas im Eisbad abgekühlt und mit 2,5 ml Citratpuffer das Insulin gefällt. Nach 5 min langem Stehen zentrifugiert man 5 min lang bei 2500 U/min.
3. Die überstehende Lösung dekantiert man in einen Meßzylinder. Das Zentrifugat wäscht man einmal mit 1 ml Citratpuffer und 3 ml Wasser und ein zweites Mal mit 3 ml Wasser. Die Waschwässer werden zu der Lösung im Meßzylinder gegeben.
Nach Auffüllen auf 20 ml mit H_2O mißt man in 10 ml dieser Lösung die Aktivität ($F_1/2$) im Flüssigkeitszählrohr und verwirft die gesamte Lösung.

(Das Zählrohr ist nach jeder Messung mit 2 n KJ-Trägerlösung auszuspülen!)

4. Das Zentrifugat wird mit 2 ml 0,05 n HCl im Wasserbad unter Umrühren gelöst und nachdem diese Lösung mit Leitungswasser abgekühlt worden ist, gibt man noch 8 ml H₂O dazu. Die Aktivität (N_1) dieser Lösung wird gemessen.
5. Die Insulinlösung wird wieder in das Zentrifugenglas zurückgegossen, mit wenig Wasser (2 ml) nachgespült, im Eisbad abgekühlt und das Insulin mit 3 ml Citratpuffer gefällt und abzentrifugiert.
6. Man dekantiert die überstehende Lösung in einen Meßzylinder. Das Zentrifugat wird mit 3 ml Wasser ausgewaschen, die Suspension zentrifugiert (5 min bei 2500 U/min) und das Waschwasser in den Meßzylinder überführt. Die Flüssigkeitsmenge wird auf 20 ml aufgefüllt, 10 ml davon werden in das Zählrohr gegeben und die Aktivität ($F_2/2$) ermittelt. Die gesamte Lösung wird verworfen.
7. In 4 ml 0,2 m Phosphatpuffer pH 8,4 löst man das Zentrifugat. Das Volumen dieser Lösung ist mit einer Kolbenpipette zu bestimmen. Die Hälfte der Lösung wird zur Aktivitätsmessung auf 10 ml aufgefüllt ($N_2/2$). Nach Dialyse und Gefriertrocknung wird ihr Gehalt an Insulin bestimmt. Die andere Hälfte wird zur Verwendung im Praktikum 2 aufbewahrt.

Die isoelektrische Fällung sollte noch ein drittes Mal wiederholt werden, wenn $F_2/2 > 10\%$ von $F_1/2$ ist.

2. Ansatz:

2 ml Insulinlösung, 2 ml Jod-131-Lösung, 0,5 ml Jod-Alkohol-Lösung und 2 ml Wasser werden in ein Zentrifugenglas gegeben und entsprechend dem ersten Ansatz verfahren.

3. Ansatz:

2 ml Insulinlösung, 2 ml Jod-131-Lösung, 0,4 ml H₂O, 1 ml Kaliumjodat-Lösung, 1 ml Kaliumjodid-Lösung und 0,1 ml 1 n Salzsäure werden in ein Zentrifugenglas gegeben und weiter verfahren wie bei dem 1. Ansatz vorgeschrieben.

4. Ansatz:

2 ml Insulinlösung, 2 ml Jod-131-Lösung, 0,5 ml JCl-Lösung und 2 ml Wasser werden in ein Zentrifugenglas gegeben; im übrigen wird wie bei den anderen Ansätzen verfahren.

Auswertung

a) Bilanz

$$F_1 + N_1 = S - X \quad (X = \text{Verlust durch Jod-Verdampfung})$$

$$F_2 + N_2 = N_1$$

$$F_3 + N_3 = N_2 \quad (\text{für den Fall, daß eine 3. isoelektrische Fällung durchgeführt worden ist.})$$

b) Beispiel zur Berechnung der spezifischen Aktivität und der Markierungsausbeute

Die Insulinlösung enthalte nach der letzten isoelektrischen Fällung x mg Insulin (= a μ Mol). Die Nutzrate der gesamten Lösung sei m Imp/min. Die Nutzrate der J-131-Lösung betrage für 1 μ Ci n Imp/min.

Daraus würde sich ergeben:

1. für den Wirkungsgrad η (in %), definiert als

$$\frac{\text{Nutzrate} \cdot 100}{\text{Emissionsrate}} :$$

$$\eta = \frac{n \cdot 100}{2,2 \cdot 10^6}$$

2. für die Aktivität A (in μ Ci) der x mg Insulin in der Lösung:

$$A = \frac{m \cdot 100}{\eta \cdot 2,2 \cdot 10^6}$$

3. für die mol-spezifische Aktivität A_s (in μ Ci/ μ Mol) des Insulins:

$$A_s = \frac{A}{a}$$

4. für die Markierungsausbeute M (in %) bezogen auf die p μ Ci eingesetzter Jod-Aktivität:

$$M(\%) = \frac{A \cdot 100}{p}$$

Literatur

- W.C. Stadie, N. Hangaard und M. Vaughan: J.Biol.Chem. 199: 731
(1952)
- E. Sounds und H.S. Williams: Nature 190: 1211 (1961)
- A. Mirsky, G. Perisutti und F.J. Dixon: J.Biol.Chem. 214: 397
(1955)

1.3 Markierung von Nucleotiden mit P-32

Die biosynthetische Markierung von Nucleotiden mit P-32 ist bisher hauptsächlich zur Erforschung des Intermediärstoffwechsels angewandt worden. So konnten Erkenntnisse über die Biosynthese von Nucleotiden und Nucleinsäuren, über die oxydative Phosphorylierung, über die Biosynthese von Proteinen und über ähnliche grundlegende Stoffwechselfvorgänge nur durch den Einsatz P-32-markierter Nucleotide gewonnen werden.

Bei der Biosynthese führt der Einbau von markiertem Phosphat in phosphorhaltige Metabolite zu markierten Verbindungen mit sehr unterschiedlicher spezifischer Aktivität. Das liegt einerseits an den unterschiedlichen metabolischen Synthesegeschwindigkeiten und andererseits daran, daß die gleichen Metabolite (z.B. Zuckerphosphate) Vor- oder Zwischenstufen verschiedener Synthesewege sind.

An wachsenden Bakterienkulturen, denen P-32-markiertes Phosphat angeboten wird, lassen sich diese Tatsachen leicht demonstrieren.

Aufgabenstellung

1. Die Verteilung des angebotenen markierten Phosphats auf die beim Aufarbeiten einer Hefesuspension anfallenden Fraktionen soll bilanzmäßig erfaßt werden.
2. Die Aktivitätsverteilung auf perchlorsäurelösliche Phosphate soll graphisch dargestellt werden.

Versuchsbeschreibung

Zu einer vorinkubierten, phosphorarmen Hefesuspension in synthetischem Medium wird P-32-markiertes Phosphat gegeben und inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Zellen durch Filtration von der Inkubationslösung getrennt. Der Filterkuchen (Zellen)

wird mit Quarzsand zermahlen und mit Perchlorsäure ausgezogen.

Der neutralisierte Perchlorsäureauszug wird durch eine Ionenaustauschersäule geschickt und eine Konzentrationsgradienten-Elution durchgeführt.

Materialien

Hefesuspension (500 mg Presshefe / 80 ml Inkubationsmedium)

synthetisches Inkubationsmedium:

2,5 g Asparagin,

0,3 g KH_2PO_4 ,

3,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und

100,0 g Saccharose in 1 l H_2O gelöst

Das Medium wird mit 0,1 n H_2SO_4 auf pH 5 gebracht.

10 μCi P-32 als Phosphat (trägerarm)

Ionenaustauscher: Dowex 1 x 8, 200 mesh, in der Formiatform (Betthöhe: 6 cm; 1 cm \emptyset)

HClO_4 (0,6 n)

NaHCO_3 (fest)

flüssiger Stickstoff

Elutionsmittel:

Linearer Gradient: Wasser bis 3 n Ameisensäure (1), dann

3 n Ameisensäure bis 2 m Ammoniumformiatlösung (2) (*)

2 Gaswaschflaschen (250 ml)

1 Zentrifugenglas (100 ml)

1 Zentrifugenglas (15 ml)

Quarzsand

Mörser

Austauschersäule

(*) Bei einem Gesamtverbrauch von 400 ml für (1) und 800 ml für (2) erhält man die unter "Beispiel" gegebene graphische Darstellung, wenn 5-ml-Fractionen ausgemessen werden.

Ausführung

1. In eine Gaswaschflasche gibt man 80 ml synthetisches Inkubationsgemisch, 500 mg feuchte Hefe und $10 \mu\text{Ci } ^{32}\text{PO}_4$. Mit einem kräftigen Luftstrom wird 5 min lang homogenisiert.
2. Die Gaswaschflasche mit der Suspension wird in ein auf 30°C vorgewärmtes Wasserbad gestellt und ein kräftiger, feuchter Luftstrom durch das Inkubationsgemisch geleitet.
3. Nach 6 Stunden Inkubation entnimmt man 0,1 ml der Suspension, verdünnt mit Wasser auf 10 ml und bestimmt die Aktivität (A) im Flüssigkeitszählrohr. Diese 10 ml verdünnter Suspension werden verworfen. (Bei der Bilanz Verdünnung beachten!)
4. Die gesamte Suspension überführt man in ein in flüssigem Stickstoff stehendes Zentrifugenglas. Das Kältebad wird entfernt und nach dem Auftauen der Suspension 10 min lang bei 2500 U/min zentrifugiert.
5. Die Aktivität (B) der überstehenden Lösung wird im Flüssigkeitszählrohr gemessen und die Lösung dann verworfen.
6. Das Sediment wird zweimal mit 10 ml Wasser durch Suspensieren und Zentrifugieren gewaschen und die Aktivität (C) der Waschwässer ermittelt.
7. Nachdem man das Sediment mit wenig Wasser (höchstens 5 ml) aufgeschlämmt hat, überführt man es in einen Mörser, vermischt es mit einer Spatelspitze Quarzsand und trocknet bei 110°C . (Vorsichtig trocknen! Eine Verfärbung der Hefe muß verhütet werden!)
8. Der trockene Hefekuchen wird im Mörser mit flüssigem Stickstoff übergossen und 5 min lang unter gelegentlichem Nachgießen von Stickstoff intensiv zerrieben.
9. Das Pulver spült man nun mit 4 ml $0,6 \text{ n HClO}_4$ in ein Zentrifugenglas, verschließt mit einem Gummistopfen, schüttelt 2 min lang gut durch und zentrifugiert 10 min lang bei 2500 U/min.

10. Den Überstand dekantiert man in ein Reagenzglas und stellt den pH-Wert mit festem NaHCO_3 auf etwa 6,5 ein.
11. Für die Aktivitätsbestimmung wird 1 ml entnommen, auf 10 ml verdünnt und gemessen (E).
12. Weitere 2 ml der Lösung werden auf die Dowexsäule gegeben und mit linearem Gradienten eluiert. (In die Vorratsflasche des Mischsystems gibt man 6 n Ameisensäure und in die Mischflasche destilliertes Wasser. Wenn die Ameisensäure-Konzentration in der Mischflasche 3 n ist, wird in die Vorratsflasche Ammoniumformiatlösung gegeben und in die Mischflasche 3 n Ameisensäure nachgefüllt. Die Flüssigkeitsmengen werden so gewählt, daß bei gleichbleibender Ameisensäure-Konzentration der Gradient des Ammoniumformiats von 0 auf 2 n ansteigt.)
13. Die Eluate werden in Fraktionen aufgefangen, deren Aktivität und Extinktion (bei 260 m μ) bestimmt wird.

Auswertung

1. Bilanz

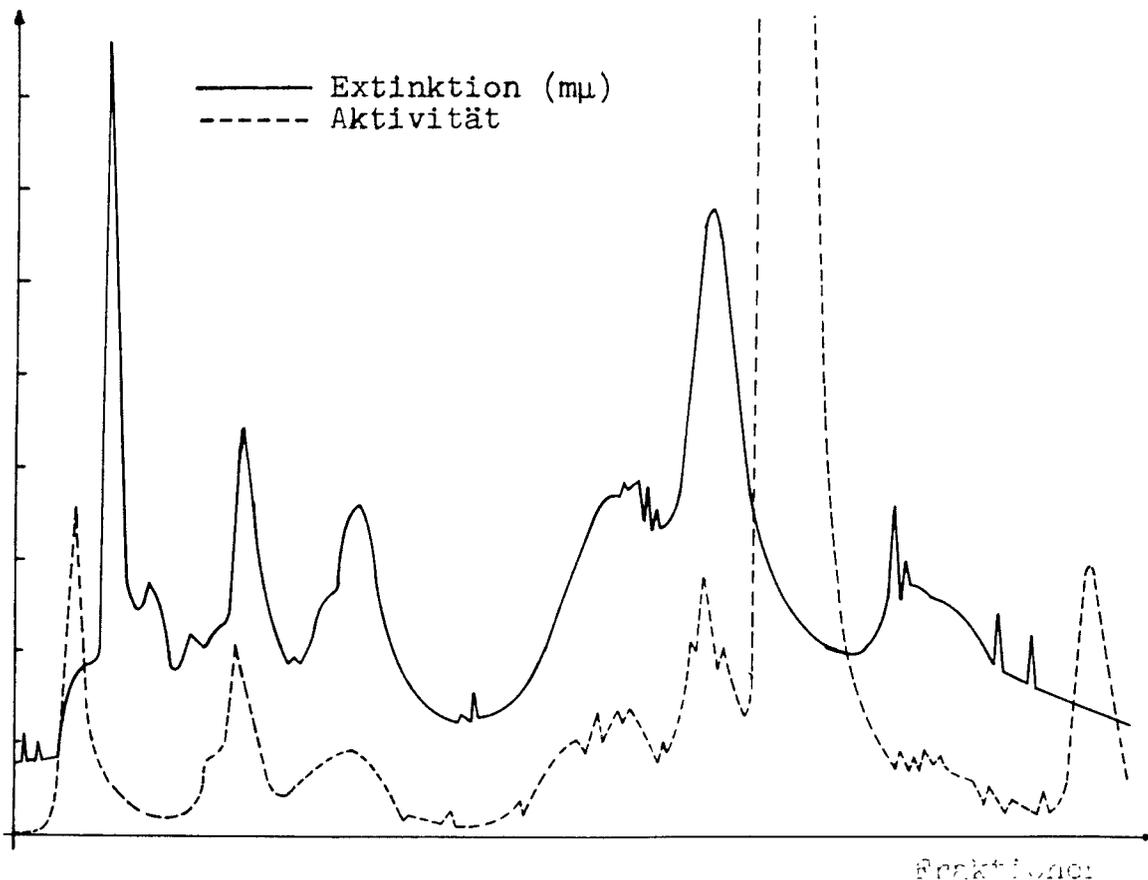
	Ipm	%
A) Aktivität des gesamten Inkubationsgemisches		100
B) Aktivität der gesamten überstehenden Lösung nach der Zentrifugation		
C) Gesamtaktivität aller Waschwässer		
D) $A - (B + C) =$ Aktivität der Hefe		
E) Aktivität der HClO_4 -löslichen Phosphate		

2. Aktivitätsverteilung in den Eluaten:

	Ipm	%
Auf die Säule aufgetragene Aktivität		100
Summe der Aktivitäten aller Fraktionen		
Position der Maxima	Glas Nr.	Ipm
1.		
2.		
3.		
4. usw.		

3. Graphische Darstellung der Aktivitätsverteilung des Eluats

Beispiel:



Literatur

E. Chargaff und J.N. Davidson: The Nucleic Acids, Acad. Press, New York, 1955

F. Reiff, R. Kautzmann, H. Lüers und M. Lindemann: Die Hefen, Hans Cael, Nürnberg, 1960

1.4 Markierung von Metaboliten mit C-14

Die uniforme Markierung von Metaboliten mit C-14 ist verhältnismäßig leicht durch Photosynthese zu erreichen. So werden z.B. zur Gewinnung markierter Zucker Grünalgenkulturen angelegt, die man mit hoch spezifisch C-14-markiertem Natriumbicarbonat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen läßt. Durch geeignetes Aufarbeiten der Algenkulturen können recht aktive Zucker isoliert werden, deren Gewinnung nach konventionellen Syntheseverfahren äußerst schwierig ist. Zur Markierung solcher synthetisch schwer zugänglicher Naturstoffe, wie es Stärke, Zucker, Pigmente, Alkaloide und andere sind, wird auch die Photosynthese höherer Pflanzen wie etwa Mohn oder Digitalis verwendet.

Aufgabenstellung

1. Die Intermediärmetabolite der Photosynthese von *Chlorella pyrenoidosa* sollen mit C-14 markiert werden.
2. Es soll gezeigt werden, daß aus dem assimilierten CO₂ nacheinander verschiedene Substanzen entstehen.

Versuchsbeschreibung

In drei Ansätze einer Algen-Synchron-Kultur wird während der Belichtungsphase C-14-markiertes NaHCO₃ als einzige Kohlenstoffquelle eingebracht.

Nach Ablauf einer bestimmten Assimilationszeit (für den 1. Ansatz 10 sec) unterbricht man die Photosynthese durch Eingießen der Algensuspension in siedenden Äthylalkohol. Der Äthanolextrakt wird eingeengt und bidimensional chromatographiert.

Die Assimilationszeiten für den 2. und 3. Ansatz sind 1 min bzw. 5 min.

Die Chromatogramme der drei Ansätze werden autoradiographiert, um den Intensitätsgrad der Markierung und die Aktivitätsverteilung auf die verschiedenen Metabolite sichtbar zu machen.

Materialien

NaHCO₃-Lösung, C-14-markiert, 5 µCi / 0,05 ml H₂O
1 Pipette für die radioaktive NaHCO₃-Lösung (0,1 ml)

Algen:

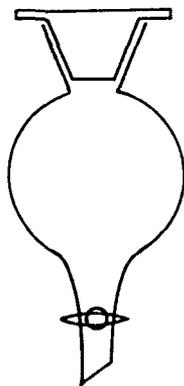
Synchron-Kultur von Chlorella pyrenoidosa, Stamm 211-8b

Nährlösung nach KUHL

Zusammensetzung:

Substanz	mg/Liter	*Herstellung des Fe-EDTA-Komplexes:
KNO ₃	1011,10	0,69 g FeSO ₄ · 7H ₂ O und 0,93 g des Dinatriumsalzes der Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)
NaH ₂ PO ₄ · 1H ₂ O	621,0	werden in 80 ml doppelt destillierten Wassers durch kurzzeitiges Kochen gelöst.
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	89,0	Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung enthält in 1 ml die nebenstehende Eisensalzkonzentration.
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,50	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	14,70	
FeSO ₄ · 7H ₂ O · EDTA*	6,95	
H ₃ BO ₃	0,061	
MnSO ₄ · 1H ₂ O	0,169	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,287	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,00249	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,01235	
pH ~ 6		

Reaktionsgefäß:



Gefäßdurchmesser: 25 mm

Abb. 1

Beleuchtung: 3 OSRAM-CONCENTRA-Lampen (je 150 Watt), die in 10 cm Abstand rund um das Reaktionsgefäß angeordnet sind.

Äthanol, unvergällt

1 Mikropipette, 0,01 ml

3 Dünnschichtplatten, 20 x 20 cm, mit Kieselgel H 250 μ dick
beschichtet

Lösungsmittel A:	Methanol	70 ml
(1. Richtung)	2 n NH_4OH	30 ml
Lösungsmittel B:	n-Butanol	80 ml
(2. Richtung)	Eisessig	20 ml
	Wasser	20 ml

3 Chromatographiekammern

3 Röntgenfilme

1 Fön

Ausführung

1. Man pipettiert 1 ml der Algensuspension in das Reaktionsgefäß (Abb. 1) und verschließt es mit einem Schliffstopfen.
2. Unter mäßigem Schütteln wird 5 min lang belichtet. Durch einen kalten Luftstrom hält man die Temperatur im Reaktionsgefäß auf etwa 30°C.
3. 5 μCi C-14-markiertes NaHCO_3 in 0,05 ml Wasser werden zu der Suspension pipettiert. Während des Pipettierens wird die Stoppuhr gestartet. Man verschließt schnell das Reaktionsgefäß und schüttelt es - unter Belichtung - während der Assimilationszeit von 10 sec, bzw. 1 min, bzw. 5 min.
4. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die Algensuspension in 8 ml siedendes Äthanol gegeben, um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen. Man zentrifugiert 5 min bei 2500 U/min, dekantiert in ein 10 ml-Becherglas und engt im siedenden Wasserbad ein. Der Rückstand im Zentrifugenglas wird in 5 ml 20 %igem Äthanol suspendiert, wieder 5 min lang bei 2500 U/min zentrifugiert und die überstehende Lösung zum

ersten Äthanolauszug gegeben.

5. Nachdem die vereinigten Überstände zur Trockene eingengt worden sind, nimmt man den Rückstand in 0,05 ml 50 %igem Äthanol auf. 0,01 ml dieser Lösung wird auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen.

Die auf den Startfleck aufgetragene Aktivitätsmenge sollte mit einem GM-Zählrohr angenähert festgestellt werden, da die Expositionszeit für das Autoradiogramm von der Aktivität abhängt. Um die aufgetragene Aktivität zu bestimmen, wird eine Vergleichslösung bekannter Aktivität unter gleichen Bedingungen gemessen und nach folgendem Ansatz die gesuchte Aktivität berechnet:

$$\text{unbekannte Aktivität} = \frac{R_N \text{ am Startfleck} \cdot \text{Aktivität des Vergleichspräp.}}{R_N \text{ des Vergleichspräparats}}$$

6. Es wird horizontal chromatographiert (siehe Abb. 2). Die Trennstrecke sollte in beiden Laufrichtungen 12 cm betragen.
7. Die Chromatogramme werden autoradiographiert.

Literatur

- M. Calvin und P. Massini: *Experientia*, 8: 445 (1952).
A.T. Wilson und M. Calvin: *J.am.chem.Soc.*, 77: 5948 (1955)
M. Calvin: *Angew.Chem.*, 74: 165 (1962)
I.A. Bassham und M. Calvin: "The Photosynthesis of carbon compounds" W.A. Benjamin u. Co., New York, (1962)
A. Kuhl und H. Lorenzen: in "Methods in Cell Physiology" S. 159, Prescott, London, (1964)

2. Nachweis radioaktiver Abbauprodukte markierter Proteine

=====

Die Hydrolyse von Proteinen kann sowohl im sauren wie im basischen Medium oder auch enzymatisch durchgeführt werden. Dabei wird der Ablauf der Hydrolyse durch die Markierung des Proteins nicht beeinflusst. In einem besonderen Fall allerdings ist eine Beeinflussung denkbar. Dann nämlich, wenn die eingeführten Fremdatome diejenigen Stellen des Proteinmoleküls besetzen, die frei sein müssen, wenn das Enzym seine Wirkung entfalten soll.

Nicht in jedem Fall führt die Hydrolyse markierter Proteine ausschließlich zu radioaktiven Abbauprodukten. Wurde z.B. ein mit S-35 biosynthetisch markiertes Protein vollständig hydrolysiert, dann finden sich neben den radioaktiven auch inaktive Aminosäuren.

Nach beendeter Hydrolyse können die entstandenen Abbauprodukte durch eine Reihe von Trennverfahren, wie Chromatographie, Elektrophorese, Molekularfiltration und andere, isoliert werden. Die Wahl des Trennverfahrens geschieht nach verschiedenen Gesichtspunkten; sie ist jedoch von der Markierungsart des Proteins gänzlich unabhängig.

Der Nachweis radioaktiver Abbauprodukte läßt sich kontinuierlich oder diskontinuierlich durchführen. So kann man z.B. Säuleneluate durch Detektoren mit angeschlossenen Schreiber fließen lassen, oder sie fraktionsweise in geeigneten Zählleinrichtungen (z.B. in einem Flüssigkeitszählrohr) messen.

Papierchromatogramme, Dünnschichtchromatogramme und Pherogramme lassen sich sektionsweise ausmessen oder mit besonders konstruierten Zählapparaturen (Scanner) abtasten. Bei diesen Trennverfahren ist der Nachweis radioaktiver Substanz auch sehr leicht durch Kontaktautoradiographie zu führen. Es können auf

diese Weise noch Substanzmengen festgestellt werden, die unter der Nachweisgrenze der üblichen Färbemethoden liegen, vorausgesetzt, daß die spezifische Aktivität hoch genug ist.

Aufgabenstellung

I. C-14-markiertes Algenprotein wird mit Salzsäure hydrolysiert und das Hydrolysat nach 3 Verfahren aufgetrennt:

1. Papierchromatographie (aufsteigend eindimensional)
2. Dünnschichtchromatographie (horizontal bidimensional)
3. horizontale Elektrophorese

II. J-131-markiertes Insulin ist mit Subtilisin zu hydrolysieren.

Die Spaltstücke des Insulins werden nach folgenden Verfahren getrennt:

1. Dünnschichtchromatographie (horizontal eindimensional)
2. horizontale Elektrophorese

Durch Kontaktautoradiographie der Chromatogramme und Pherogramme wird die Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Abbauprodukte sichtbar gemacht. Weiterhin wird die Lage der Abbauprodukte durch Anfärben mit Ninhydrin festgestellt.

Materialien

C-14-markiertes Algenprotein (etwa 100 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$)

J-131-markiertes Insulin* (siehe S. 14)

36 %ige Salzsäure

Subtilisin (10 mg/ml Phosphatpuffer, pH 8,4; siehe Seite 15)

Laufmittel für das eindimensionale aufsteigende Papierchromatogramms des Algenproteinhydrolysates:

Methanol	80 ml
Wasser	20 ml
Pyridin	4 ml

* Die spezifische Aktivität hängt vom Markierungsverfahren ab und liegt zwischen 0,5 und 2 μCi pro 20 mg Insulin.

Laufmittel für die bidimensionale horizontale Dünnschichtchromatographie des Algenproteinhydrolysates:

Laufmittel A:	Chloroform	40 ml
(1.Richtung)	Methanol	40 ml
	Ammoniak, 17 %ig	20 ml
Laufmittel B:	Phenol	75 g
(2.Richtung)	Wasser	25 g

Laufmittel für die eindimensionale horizontale Dünnschichtchromatographie des Insulinhydrolysates:

n-Butanol	80 ml
Eisessig	20 ml
Wasser	20 ml

Pyridinpuffer pH 3,9 für die elektrophoretische Trennung der beiden Proteinhydrolysate:

Eisessig	10 ml
Pyridin	3 ml
auf 750 ml mit Wasser auffüllen	

Ninhydrin-Sprühreagenz

Kupfer-Nitrat-Sprühreagenz

1 Streifen Chromatographiepapier S.u.S. 2043 b mg1 50 x 12 cm
(mit aufgetragenen Testaminosäuren)

2 Dünnschichtplatten (20 x 20 cm) mit Kieselgel H beschichtet
1 Mikropipette (0,01 ml) (250 μ)

Filtrierpapier für Elektrophorese (S.u.S. 2043 a mg1)

Elektrophoresegerät

Chromatographiezylinder

Chromatographieschale

Sprüher

Fön

Ausführung

A) Hydrolyse des C-14-markierten Algenproteins:

0,1 ml Algenproteinlösung (5 μ Ci) und 0,15 ml 36 %ige Salz-

säure werden in ein kleines Reagenzglas pipettiert. Das Gläschen wird zugeschmolzen und für etwa 16 Stunden in einen Trockenschrank (105°C) gestellt. Anschließend wird die Salzsäure abgedampft und der Rückstand in 0,1 ml Wasser aufgenommen.

B) Hydrolyse des J-131-markierten Insulins:

Zu 2 ml des markierten Insulins (in Phosphatpuffer pH 8,4) pipettiert man 0,05 ml der Subtilisinlösung und inkubiert etwa 16 Stunden bei 37°C . Danach wird unter milden Bedingungen auf 1 ml eingeeengt.

C) Aufsteigende eindimensionale Papierchromatographie des Algenproteinhydrolysates:

1. 0,005 ml ($0,25 \mu\text{Ci}$) des Proteinhydrolysates werden mit der Mikropipette auf den Startpunkt des Chromatographiestreifens aufgetragen und mit Heißluft getrocknet.
2. Den Streifen hängt man in den Chromatographiezylinder. Er darf das Laufmittel nicht berühren. 15 Minuten später taucht man ihn etwa $1/2$ cm tief in das Laufmittel. Die Entwicklungszeit beträgt 6 Stunden.
3. Der Streifen wird aus dem Zylinder genommen und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

D) Horizontale bidimensionale Dünnschichtchromatographie des Algenproteinhydrolysates:

1. Auf eine Dünnschichtplatte werden mit der Mikropipette 0,005 ml des Hydrolysates aufgetragen und der Fleck mit Heißluft getrocknet. 10 cm in jeder Richtung vom Startpunkt aus wird eine Marke angebracht.
2. Man gibt 100 ml des Laufmittels A in die Chromatographiekammer und legt die Dünnschichtplatte ein. (Abb. 2)

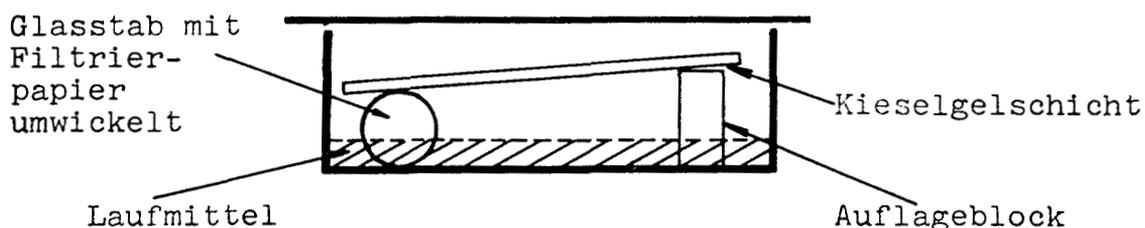


Abb. 2

3. Wenn die Laufmittelfront die 10 cm-Marke erreicht hat (etwa nach 40 Minuten), wird die Platte aus der Kammer genommen und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.
 4. Nach Reinigen der Kammer und Umwickeln des Glasstabes mit neuem Filtrierpapier wird in der zweiten Richtung chromatographiert.
- E) Horizontale Elektrophorese des Algenprotein- und des Insulinhydrolysates:
1. Der Elektrophoresekasten wird mit Pyridinpuffer beschickt und die Filtrierpapierstreifen mit dem gleichen Puffer befeuchtet.
 2. Mit der Mikropipette trägt man auf den Startpunkt des einen Streifens 0,02 ml (1,0 µCi) des Algenproteinhydrolysates auf und auf den anderen Streifen 0,04 ml des Insulinhydrolysates.
 3. Man läßt die Kammer 4 Stunden unter Stromfluß (etwa 250 Volt). Die Streifen werden anschließend bei 60°C getrocknet.
- F) Horizontale eindimensionale Dünnschichtchromatographie des Insulinhydrolysates:
1. Man markiert auf einer Dünnschichtplatte zwei Startpunkte, die etwa 10 cm voneinander entfernt liegen sollen.
 2. 0,01 ml des Insulinhydrolysates wird auf jeden Startpunkt aufgetragen und weiter nach Punkt D 2 verfahren. Die Laufstrecke soll 12 cm betragen.
- G) Der Elektrophoresestreifen des Algenproteinhydrolysates wird in seiner ganzen Länge am Rand mit Marken versehen, die 0,5 cm Abstand voneinander haben sollen. Bei jeder Marke wird die Aktivität des Streifens mit einem Glockenzählrohr gemessen, dessen Fenster durch eine 2 mm-Schlitzblende begrenzt ist. Die Aktivitätsraten sind auf Millimeterpapier gegen den jeweiligen Abstand vom Startpunkt aufzutragen.

H) Die Chromatogramme und Pherogramme werden autoradiographiert. Gesondert behandelt man das Dünnschichtchromatogramm des Insulinhydrolysates:

Eine Hälfte wird mit Ninhydrin und Kupfernitrat besprüht, mit einer Kunstharzlösung fixiert und abgezogen. Von der verbleibenden Hälfte macht man eine Autoradiographie.

I) Nach der Autoradiographie werden die Chromatogramme und Pherogramme mit Ninhydrin und Kupfernitrat angefärbt (Ausnahme: Dünnschichtchromatogramm des Insulinhydrolysates) und mit ihren Autoradiogrammen verglichen.

Literatur

J.M. Hais u. K. Macek: Handbuch der Papierchromatographie,
I. Band 1958, II. Band 1960
Verlag Gustav Fischer, Jena

E. Stahl: Dünnschicht-Chromatographie, Springer-Verlag 1962

3. Untersuchung eines biochemischen Vorgangs mit Hilfe einer C-14-markierten Substanz

=====

Bei der Untersuchung biochemischer Vorgänge mit markierten Substanzen sollte gesichert sein, daß die Eigenschaften der markierten Substanz vor und nach der Markierung identisch sind. Diese Forderung ist nicht leicht zu erfüllen, da die Art der Markierung die Eigenschaften einer Substanz erheblich verändern kann. Besonders bei Markierung mit einem molekülfremden Radionuklid oder bei Markierungsmethoden, die einen oxidativen oder reduktiven Syntheseschritt einschließen, ist damit zu rechnen.

Ist die oben gestellte Forderung nach chemisch gleichem Verhalten von markierter und unmarkierter Substanz mit C-14 als "Tracer" nicht zu erfüllen, so ist eine Tritium-Markierung nach WILZBACH (1) zu erwägen. Allerdings ist zu bedenken, daß der bei Tritium besonders große Isotopieeffekt das Versuchsergebnis verfälschen kann.

Sehr einfach gelingt die Demonstration der Aufnahme von Aminosäuren durch Mikroorganismen, wenn eine C-14-markierte Aminosäure verwendet wird. Sie sollte für den Mikroorganismus nicht metabolisierbar sein, um den biochemischen Vorgang der Aufnahme nicht unnötig zu komplizieren.

Im vorliegenden Praktikum kann eine am Carboxylkohlenstoff, also spezifisch markierte Aminosäure angewandt werden, weil sie nicht metabolisiert wird.

Aufgabenstellung

1. Die Aufnahme von α -Aminoisobuttersäure (AiB) durch Algen soll in Abhängigkeit von der Konzentration der Aminosäure im Inkubationsansatz registriert werden.

(1) K.E. Wilzbach: J.am.chem.Soc. 79: 1013 (1957)

2. Durch graphische Darstellung der Ergebnisse soll entschieden werden, ob es sich um Diffusion oder Anreicherung handelt.
3. Der Quotient der AiB-Konzentrationen im Inkubationsansatz und in den Algenzellen soll bei verschiedenen Konzentrationen nach 5 min Inkubation bestimmt werden.

Versuchsbeschreibung

In 5 Ansätzen wird eine Algensuspension mit einer Nährlösung, die C-14-markierte AiB enthält, 5 min lang unter Sauerstoffbeatmung inkubiert.

Der Unterschied zwischen den einzelnen Ansätzen besteht nur darin, daß die Konzentration der AiB verschieden ist.

Aus jedem Inkubationsansatz werden die Algen abgenutscht und mit H₂O gewaschen. Man mißt die Aktivität der getrockneten Algen und auch die des Filtrats (Medium + Waschwasser).

Auf Millimeterpapier wird die Nutzrate jedes Algenpräparates gegen die jeweilige Konzentration der AiB im Inkubationsansatz aufgetragen.

Der Quotient der AiB-Konzentrationen läßt sich aus den Aktivitätsmessungen der Hefe einerseits und der Filtrate andererseits berechnen.

Materialien

α -Aminoisobuttersäure-1-C-14 (spez.Akt.: 10 μ Ci/ μ Mol) Gesamtaktivität: 10,9 μ Ci

1 Vollpipette (2 ml) für aktives Medium

Algensuspension:

Die Algen einer Synchronkultur von *Chlorella pyrenoidosa* Stamm 211-8b werden abzentrifugiert und mit Nährmedium nach KÜHL (siehe Seite 25) auf eine Konzentration von etwa 50 mg/ml gebracht.

Inkubationsmedien:

Lösung 1:	0,3	µCi	AiB-1-C-14	und	1,5	µMol	AiB	in	2 ml	Nähr-
Lösung 2:	0,6	"	"	"	3,0	"	"	"	"	medium
Lösung 3:	1,0	"	"	"	5,0	"	"	"	"	"
Lösung 4:	3,0	"	"	"	15,0	"	"	"	"	"
Lösung 5:	6,0	"	"	"	30,0	"	"	"	"	"

1 Vollpipette (1 ml)

1 Hahn'sche Nutsche 3 cm Ø

5 Inkubationsröhrchen

Glasfaserfilter S.u.S. Nr. 6

Thermostat

Sauerstoffgas

Ausführung

1. In 5 numerierte Inkubationsröhrchen gibt man je 1 ml Algen-suspension.
2. Das Röhrchen Nr. 1 wird im Wasserbad (30°C) 10 min lang unter Sauerstoffbeatmung äquilibriert.
3. Dann setzt man 2 ml der 30°C-warmen AiB-Lösung Nr. 1 zu und inkubiert 5 min lang.
4. Auf einer Hahn'schen Nutsche werden die Zellen vom Inkuba-tionsmedium durch Absaugen getrennt und mit 1 ml H₂O ge-waschen.
5. Nachdem der Zellkuchen trocken gesaugt worden ist, wird er unter einer Infrarotlampe nachgetrocknet und anschließend seine Aktivität gemessen.
6. 1 ml des Filtrats (Medium + Waschwasser) wird auf einem Meßschälchen eingedampft und ebenfalls ausgemessen.

Mit den anderen vier Ansätzen verfährt man entsprechend.

Auswertung

Man tabelliert die Nutzrate jedes Algenpräparates gegen die ent-sprechende Konzentration der AiB (µMol/ml) im Inkubationsansatz und stellt auf Millimeterpapier die Ergebnisse graphisch dar.

Für jeden Ansatz wird der Quotient der AiB-Konzentrationen Q folgendermaßen errechnet:

$$Q = \frac{R_N \text{ von 1 g Algen}}{R_N \text{ von 1 ml Filtrat}}$$

R_N = Nutzrate

In diesem Ansatz soll das Gewicht von 1 ml Filtrat gleich 1 g angenommen werden.

Die errechneten Quotienten sollen den dazugehörigen α -AiB-Konzentrationen im Inkubationsansatz gegenübergestellt werden:

$\mu\text{Mol AiB/ml}$	R_N Algen	Q
0,5		
1,0		
1,7		
5,0		
10,0		

Literatur

J.T. Holden: "Amino Acid Pools", Elsevier Publ. Co. Amsterdam
S. 566 ff (1962)

H.N. Christensen, A.J. Aspen, E.G. Rice: J.Biol.Chem., 220:
287 (1956)

4. Verteilung und Dekorporation von Ce-144

=====

Cer und andere seltene Erden werden zwar aus dem Magen-Darm-Trakt kaum resorbiert (0,1 %), aber die in die Blutbahn gelangende Menge (Verletzungen, Inhalation) wird schnell zu etwa 50 % in der Leber und rund 30 % im Skelett gespeichert. Die natürliche Ausscheidung aus diesen Organen ist langsam, so daß z.B. bei Inkorporation von Ce-144, dessen Tochter Pr-144 ein energiereicher (etwa 3 MeV) β -Strahler ist, mit Strahlenschädigung gerechnet werden muß.

Aus einer Reihe von Untersuchungen über die Dekorporation von Radionukliden, insbesondere von Uranspaltprodukten, geht hervor, daß die metallischen Elemente durch Chelatbildner aus dem Organismus entfernt werden können (CATSCH et al.). Als Chelatbildner wurde im Falle des Ce-144 Diäthylentriaminpentaessigsäure (DTPA) verwendet.

Aufgabenstellung

1. Es soll gezeigt werden, wie ein Chelatbildner (DTPA) die Ausscheidungsgeschwindigkeit von Ce-144 (trägerarm) aus dem Organismus der Ratte beeinflusst.
2. 8 Tage nach der Injektion von Ce-144 (trägerarm) soll untersucht werden, ob sich das Verteilungsmuster des Ce-144 in den Leberzellfraktionen durch den Chelatbildner verschoben hat.

Versuchsbeschreibung

Einer Gruppe weiblicher Albinoratten werden in die Schwanzvene 5 μ Ci Ce-144 injiziert. Eine Hälfte der Tiergruppe erhält 4 Tage später eine Dosis Chelatbildner intraperitoneal appliziert.

Die tägliche Elimination von Urin und Fäces wird im Stoffwechselfäßig getrennt aufgefangen und auch einzeln aufgearbeitet. 8 Tage nach der Ce-144-Injektion werden sämtliche Tiere getötet.

Aliquote Teile von Leber- und Nierenhomogenaten *) dampft man auf Meßschälchen ein und mißt die Aktivität.

Die Oberschenkelknochen werden getrocknet, zerkleinert und die Aktivität eines aliquoten Teils gemessen.

Durch Differentialzentrifugation (nach SCHNEIDER) stellt man aus den Leberhomogenaten in 0,25 m Saccharoselösung folgende Fraktionen her:

Zellkerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Cytoplasma. Diese Fraktionen sind nicht einheitlich, sondern stellen nur angereicherte Organellenfraktionen dar. In aliquoten Teilen dieser Fraktionen wird die Aktivität gemessen.

Materialien

weibliche Albinoratten, 9-12 Wochen alt,

5 μCi Ce-144 (pro Tier)

1 Injektionsspritze (1 ml) für Ce-144-Aktivität

Bezugsstandard-Lösung:

5 μCi Ce-144 in 50 ml 0,1 %iger DTPA-Lösung

250 μMol Na_3CaDTPA (pro Tier)

1 Injektionsspritze (2 ml)

Saccharoselösung, 0,25 m

Stoffwechselkäfige

Operationsmaterial

Teflon-Homogenisator (nach POTTER und ELVEJHEM)

Klebstoff-Aceton-Lösung, 20 %ig

Diamantmörser

Ausführung

1. Jede Ratte erhält 5 μCi Ce-144 (trägerarm) als CeCl_3 (pH 3) in die Schwanzvene injiziert.
2. Mit derselben Spritze wird die gleiche Menge aktiver Lösung in einen 50 ml Meßkolben gegeben und mit 0,1 %iger DTPA-

*) Hergestellt nach SCHNEIDER unter Verwendung des Homogenisators nach POTTER und ELVEJHEM.
(Literatur am Ende der Praktikumsvorschrift)

Lösung aufgefüllt. Die Aktivität von 0,5 ml dieser Lösung (der 100. Teil des Bezugsstandards) wird auf einem Schälchen eingedampft und gemessen.

3. Denjenigen Tieren, die 4 Tage nach der Ce-144-Injektion den Chelatbildner DTPA erhalten sollen, werden 250 μMol Na_3CaDTPA intraperitoneal verabreicht.
4. Die tägliche Urinmenge jeder Ratte wird auf 10 ml aufgefüllt, davon 1 ml im Meßschälchen eingetrocknet und die Aktivität gemessen.
5. Die Gesamtmenge der pro Tag ausgeschiedenen Fäces wird 1 Stunde lang bei 105°C getrocknet, dann gewogen, mit 3 ml Aceton in der Reibschale zerrieben und wieder getrocknet. In ein Meßschälchen wiegt man etwa 100 mg des Trockenrückstandes ein, fixiert mit etwas Klebstoff-Aceton-Lösung und mißt die Aktivität.
6. Am 8. Tag öffnet man nach 12stündigem Fasten den Ratten unter Äthernarkose den Abdomen und spült die Leber von der Vena cava aus mit eiskalter 0,25 m Saccharoselösung. Die Vena porta wird durchtrennt.
7. Man entnimmt die Leber und homogenisiert in einem vorgekühlten Homogenisator (nach POTTER und ELVEJHEM) mit 1 bis 2 ml 0,25 m Saccharose unter Kühlung.
8. Mit den Nieren wird, abgesehen von der Spülung, genauso verfahren und das Homogenat mit H_2O auf 10 ml aufgefüllt. Ein aliquoter Teil (z.B. 1 ml) wird zur Aktivitätsbestimmung auf einem Schälchen eingetrocknet und gemessen.
9. Ein Femur wird fleischfrei präpariert, 6 Stunden bei 105°C getrocknet, dann gewogen und im Diamantmörser zerrieben. Von dem staubfeinen Material werden etwa 100 mg in ein Meßschälchen gewogen, mit Klebstoff-Aceton-Lösung fixiert und die Aktivität gemessen.
10. Das Leberhomogenat befreit man von Bindegewebsresten, bringt mit 0,25 m Saccharose-Lösung auf 50 ml und zentrifugiert, nachdem ein aliquoter Teil entnommen werden ist. Der Aliquot

(z.B. 0,5 ml) wird auf einem Meßschälchen eingetrocknet und gemessen.

11. Die Fraktionierung (nach SCHNEIDER) des Homogenats erfolgt in einer Kühlzentrifuge nach folgendem Schema:

1. 10 min bei 600 x g : Zellkerne. Zentrifugat mit H₂O auf 10 ml aufgefüllt
2. 10 " " 8500 x g : Mitochondr. "
3. 60 " " 18000 x g : Mikrosomen "
4. 18000 x g Überstand : Cytoplasma. Mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Aliquote Teile dieser Fraktionen werden auf Meßschälchen eingedampft und zur Aktivitätsmessung gebracht.

12. Alle Aktivitätsmessungen sind in derselben Meßanordnung durchzuführen. Zur Auswertung der Ergebnisse wird folgende tabellarische Anordnung vorgeschlagen:

1. Meßergebnisse

Standard: I/min/0,5 ml I/min/50 ml
(inj.Ce-Dosis)

1. Leber

a) Homogenat

	Aliquot	I/min	Gesamtfr.	I/min	% des inj. Ce
	0,5 ml		50 ml		

b) Leberzellfraktionen

	Aliquot	I/min	Gesamtfr.	I/min	% des inj. Ce
600 x g	1 ml		10 ml		
8500 x g	1 ml		10 ml		
18000 x g	1 ml		10 ml		
Überstand	2 ml		100 ml		

Summe

2. Niere

	Aliquot	I/min	Gesamtfr.	I/min	% des inj. Ce
Homogenat	1 ml		10 ml		

3. Skelett

	Aliquot	I/min	Femur x 20	I/min	% des inj. Ce
Femur	mg		mg		

4. Exkremente

a) Fäces

	Aliquot	I/min	Tageselim.	I/min	% des inj. Ce
1. Tag	mg		mg		
2. Tag	mg		mg		
3. Tag	mg		mg		
4. Tag	mg		mg		
5. Tag	mg		mg		
6. Tag	mg		mg		
7. Tag	mg		mg		
8. Tag	mg		mg		

Summe

b) Urin

	Aliquot	I/min	Tageselim.	I/min	% des inj. Ce
1. Tag	1 ml		ml		
2. Tag	1 ml		ml		
3. Tag	1 ml		ml		
4. Tag	1 ml		ml		
5. Tag	1 ml		ml		
6. Tag	1 ml		ml		
7. Tag	1 ml		ml		
8. Tag	1 ml		ml		

Summe

2. Vergleichswerte

Mittelwerte in % der injizierten Ce-144-Dosis

	Leber	Niere	Skelett	Fäces	Urin
mit DTPA					
ohne DTPA					

3. Verteilungsmuster der Leberzellfraktionen

	600 x g	8500 x g	18000 x g	Überstand
mit DTPA				
ohne DTPA				

Literatur

1. A. Catsch: Strahlentherapie, 114: 1, (1961)
2. A. Catsch, H. Immel-Teller und D. Schindewolf-Jordan:
Z.f. Naturforschung, 16 b: 181 (1961)
3. V.R. Potter und C.A. Elvejhem: J.biol.chem., 114: 495 (1936)
4. W.C. Schneider: J.biol.chem., 176: 259 (1948)