

# Teil 2: Inhalt Praktikum 1

Qualitative und quantitative Analyse von chemischen und biologischen Substanzen des Körpers im bio-chemisch-medizinischen Labor.



Halb bis vollautomatische Analysenstrasse für Routine-Analysen

= „Black Box“ → Kennenlernen der Methoden mit Geräten für Spezialanalysen

# Inhalt von Praktikum 1

**1. DC von Aminosäuren**

**2. Pipettierübung (Präzisionskontrolle)**

**3. Gelfiltration**

**4. Elektrophoretische Trennung von Serumproteinen**

# Trennmethoden

- Dünnschichtchromatographie
- Ionenaustauschchromatographie
- Reversed Phase Chromatography  
(apolare stationäre Phase, polares Elutionsmittel = mobile Phase)
- Gaschromatographie
- Gelfiltration (Größenausschluss Chromatographie)
- Affinitätschromatographie
  
- Elektrophorese

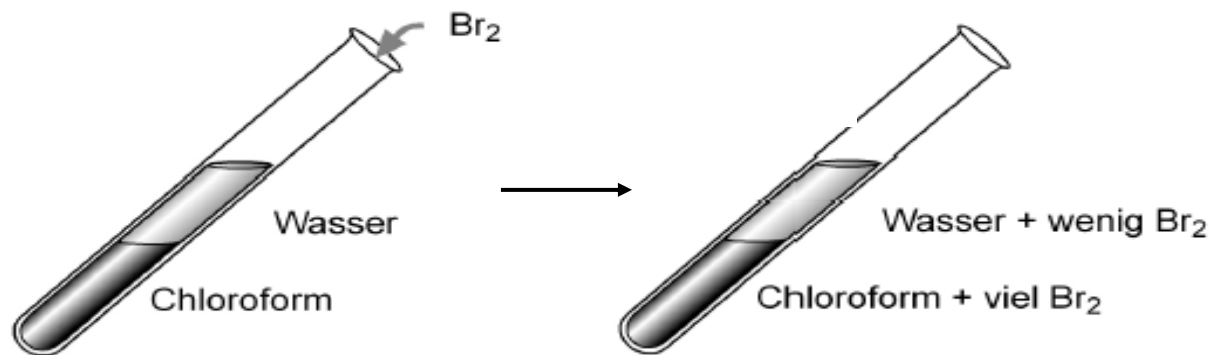
Allen Methoden ist gemeinsam, dass die Moleküle durch den unterschiedlich langen Aufenthalt in zwei nicht mischbaren Phasen getrennt werden.

Phasen sind z.B. Lösungsmittel, Oberflächen, Antikörper, ...

# Nernstscher Verteilungssatz

Beschreibt die Verteilung eines Stoffes zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Phasen (z.B. gasförmig / flüssig oder flüssig / fest oder flüssig / flüssig).

$$\text{Verteilungskoeffizient } c = \frac{[\text{Br}_2]_{\text{Wasser}}}{[\text{Br}_2]_{\text{Chloroform}}}$$



Chemie erleben Wawra et al.

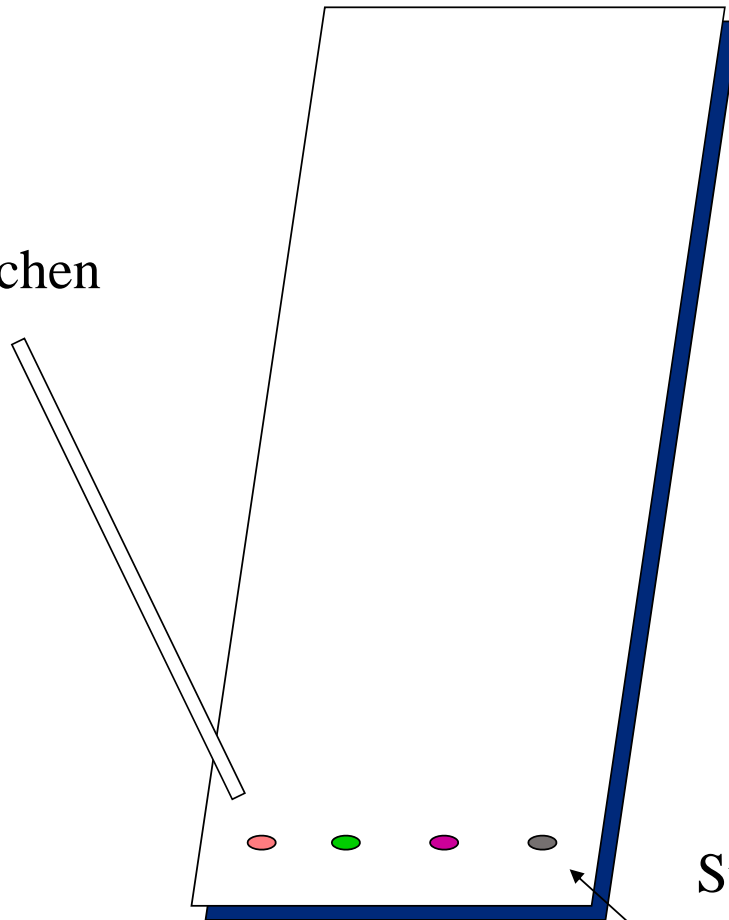
# 1. Trennung von Aminosäuren mittels der Dünnschichtchromatographie

- Stationäre Phase
  - Zellulose auf Aluminiumträger,  
(= mit Wasser gefülltes Gel)  
= **hydrophil**
- Mobile Phase
  - Organisches Lösungsmittel  
= **hydrophob**



# Auftragen der Proben

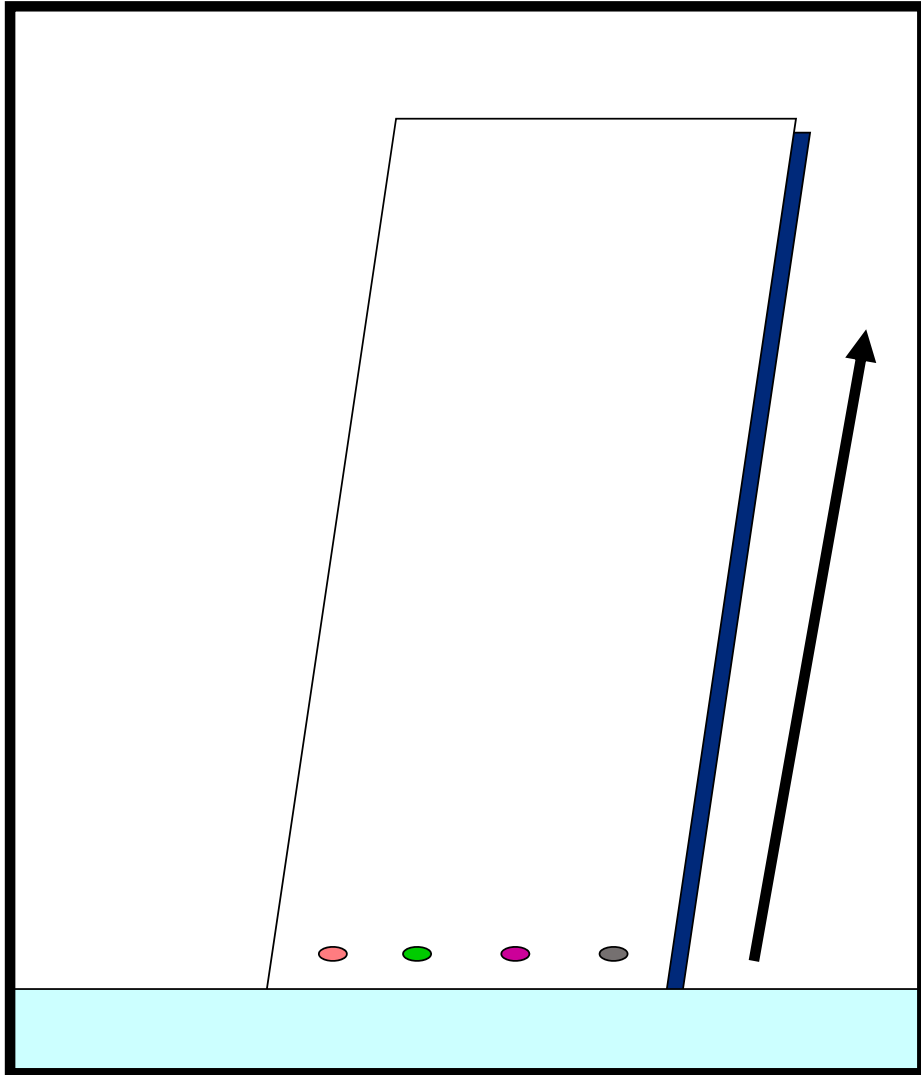
Glasröhrchen



Zellulose auf Alufolie

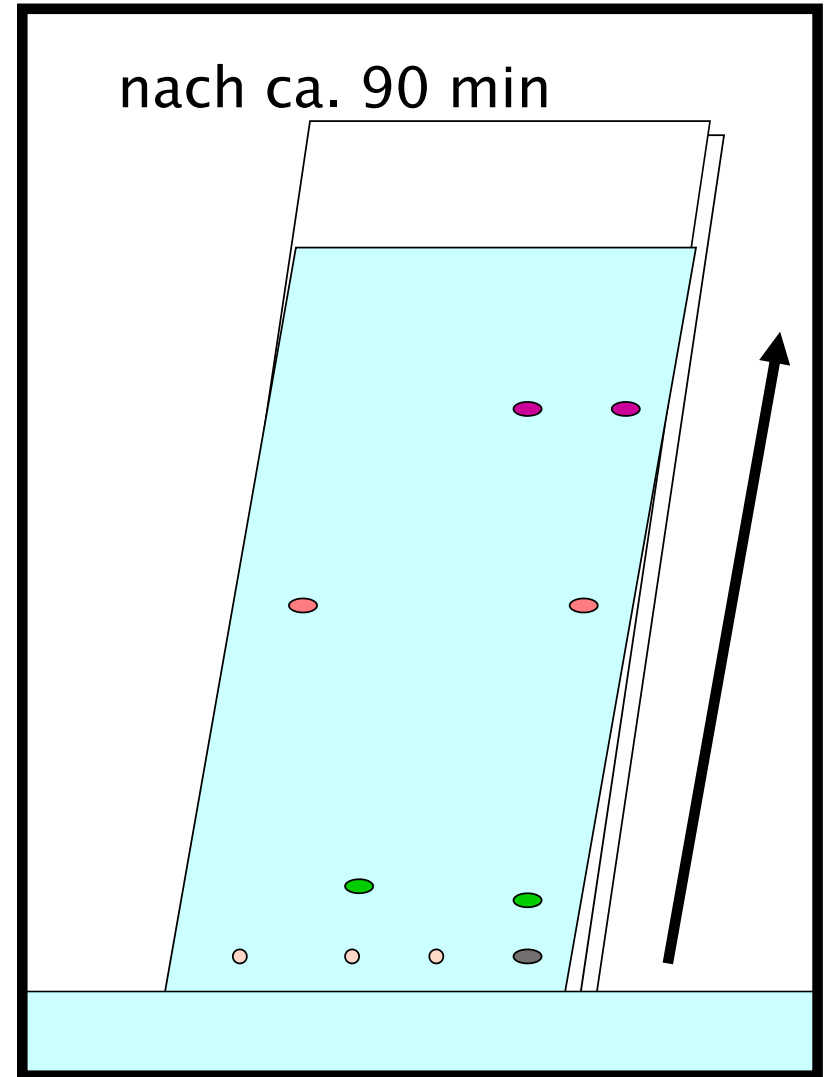


Standard, Referenzwert



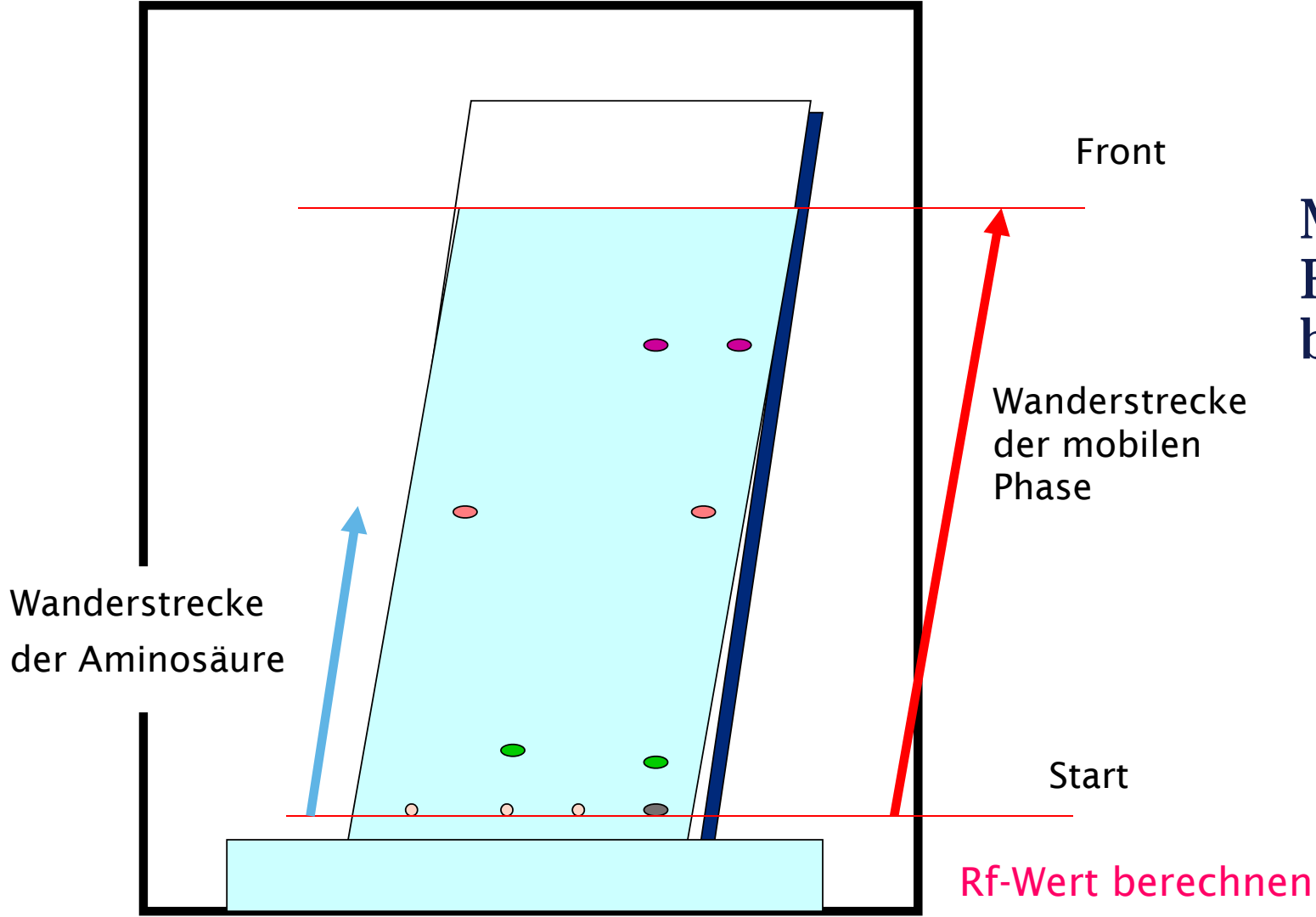
Glastrog

Laufmittel=  
mobile Phase

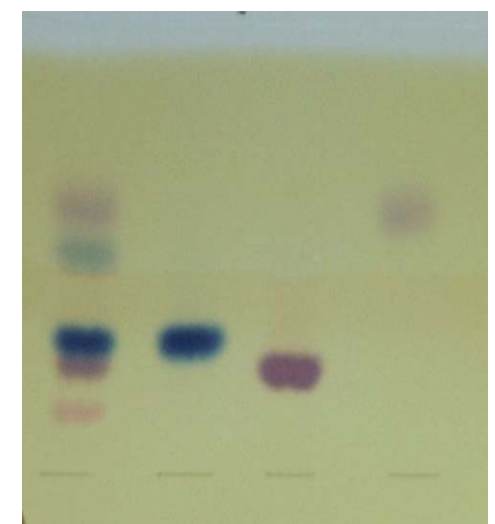


nach ca. 90 min

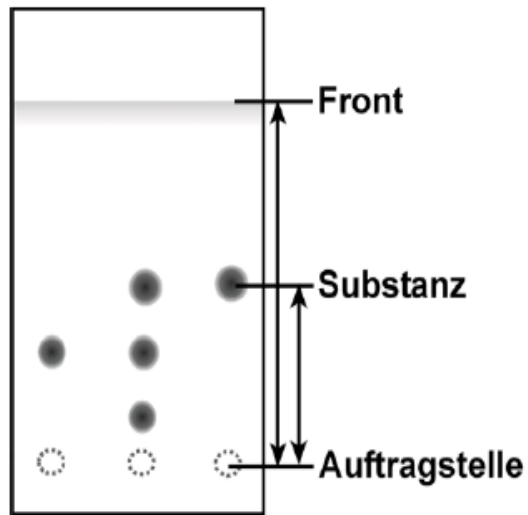




**Markieren der Front & Rf-Wert berechnen**



# Auswertung



Chemie erleben, Wawra et al.

$$\frac{W(as)}{W(m)} = Rf(as) = \text{Retentionsfaktor}$$
$$\frac{[\text{Aminosäure}]_{\text{mobile Phase}}}{[\text{Aminosäure}]_{\text{stationäre Phase}}} = \text{Verteilungskoeffizient } c$$

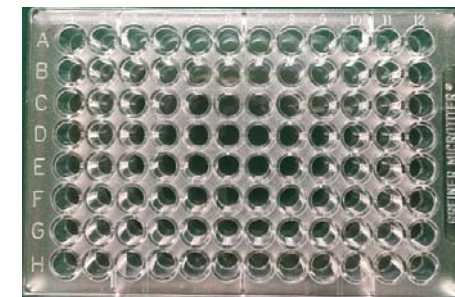
## Nernstscher Verteilungssatz

Beschreibt die Verteilung eines Stoffes zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Phasen.

(z.B. gasförmig/flüssig oder flüssig/fest oder flüssig/flüssig).

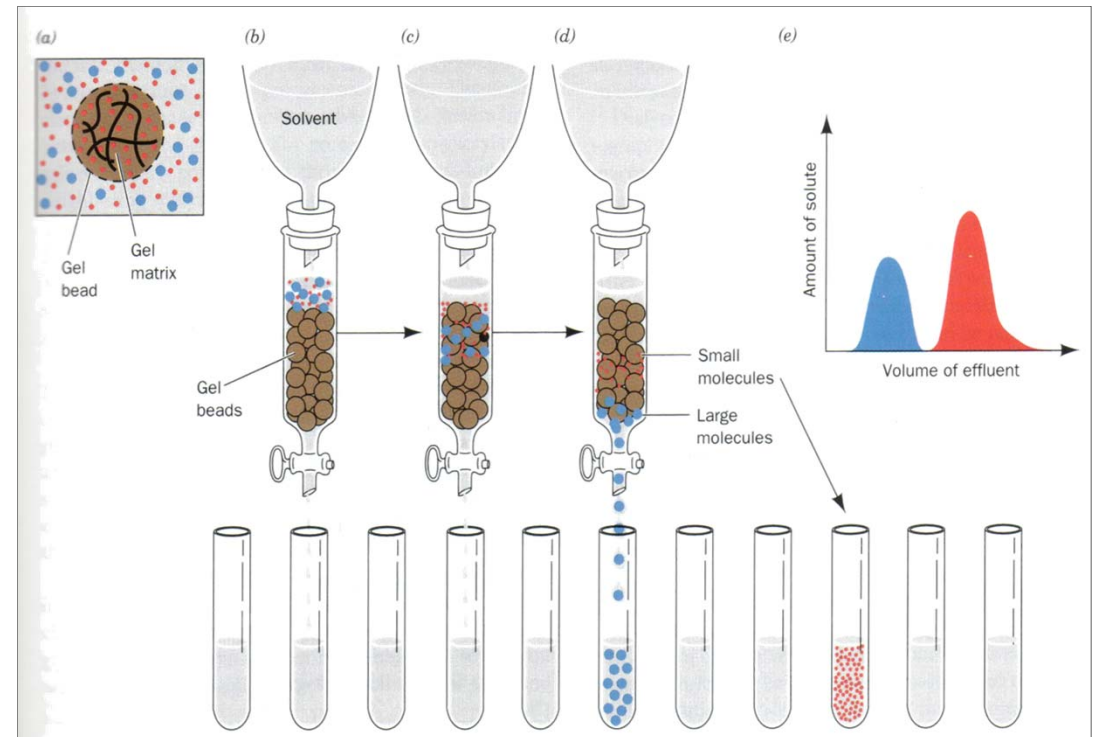
## 2. Pipettierübung (Präzisionskontrolle)

1. In eine Mikrotiterplatte werden in eine Spalte achtmal **125 µl Wasser** pipettiert und
2. **75 µl gelbe Farbstofflösung** zugesetzt.
3. Nach Pipettieren der Farbstofflösung wird durch mehrfaches Aufziehen mit der Pipette gemischt!
4. Die 1. Spalte dient als Leerwert (LW), in die nur destilliertes Wasser (200 µl) pipettiert wird.
5. Die Konzentration des Farbstoffs in diesen Mischungen wird durch Messung der Extinktion bei 415 nm mit einem Photometer bestimmt.
6. Berücksichtigen Sie bei Ihrer Auswertung den LW, indem sie den Mittelwert des LWs bilden und diesen von Ihren Messwerten abziehen! Aus den so erhaltenen 8 Werten/Spalte errechnen Sie nun jeweils den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten. Das Resultat kann bei einem VK <10 % als zufriedenstellend angesehen werden und sollte idealerweise unter 5% liegen.

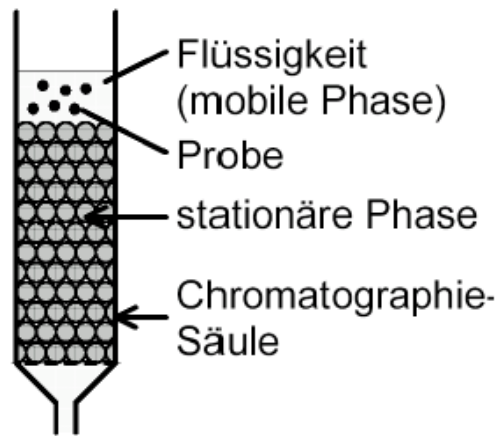


# 3. Gelfiltration

- Trennung nach Molekülgröße
- Gel als “Molekularsieb”
  - kleine Moleküle können in Poren der Gelteilchen eindringen:  
→ längerer Weg → verzögerte Wanderung
  - große Moleküle sind ausgeschlossen:  
→ kürzerer Weg → schnelle Wanderung
- Matrix: Dextrane, Polyacrylamid



# Gelfiltration Fraktionierung

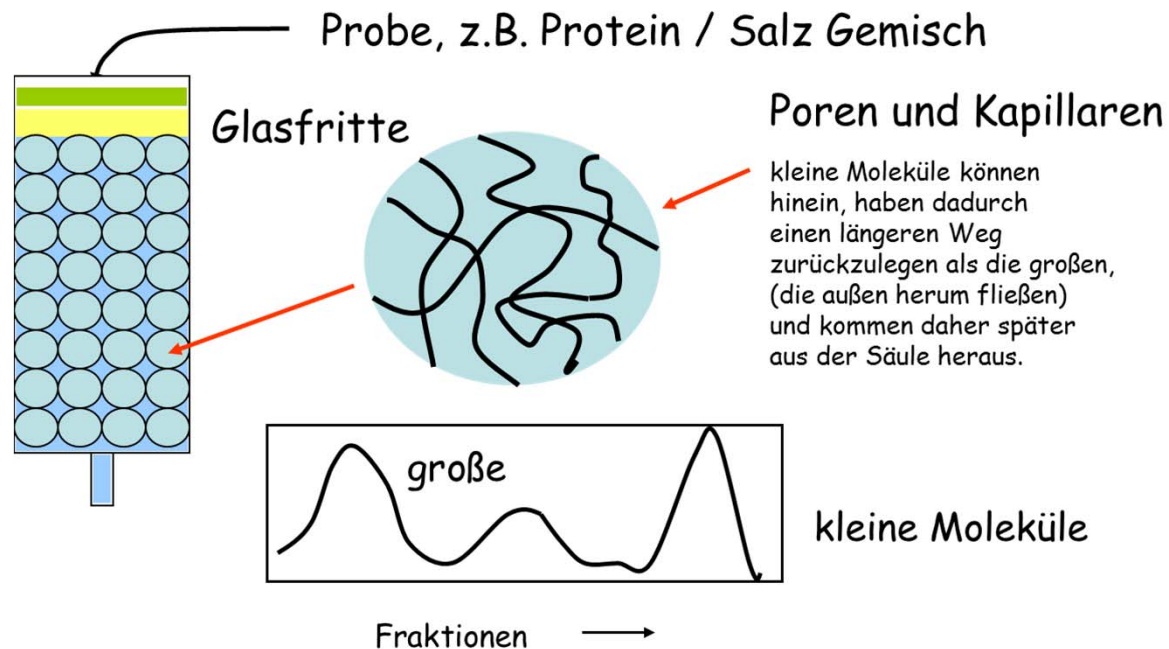


Säulenchromatographie

Chemie erleben, Wawra et al.



# Schema der Trennung eines Dextranblau / Methylrot Gemisches mittels Gelfiltration

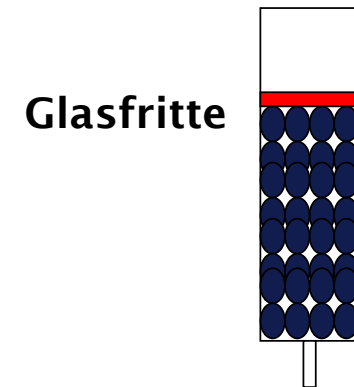


**Dextranblau:** großes Molekül, eluiert zuerst  
**Methylrot:** kleines Molekül, kommt später aus der Säule heraus

# Trennung eines Dextranblau / Methylrot Gemisches mittels Gelfiltration

- Sephadex G25 Säulenmaterial in Elutionspuffer (= mobile Phase) equilibriert.
- 0.5 ml der Probe direkt auf die trockengelauene Glasfritte auftragen.  
(Dextranblau und Methylrot)
- Wenn vollkommen ins Säulenmaterial eingedrungen, ca. 5 ml Elutionspuffer nachspülen.
- Austretender Elutionspuffer in Fraktionen zu je 20 Tropfen (= ca. 1 ml) sammeln.
- Um Methylrot sichtbar zu machen, Fraktionen mit 1 Tropfen HCl ansäuern.

*Details morgen im Praktikum*



# Ionenaustausch- bzw. Affinitätschromatographie

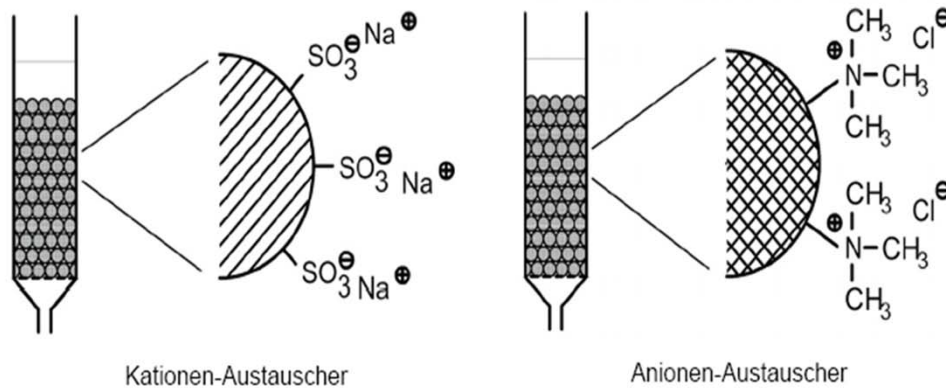
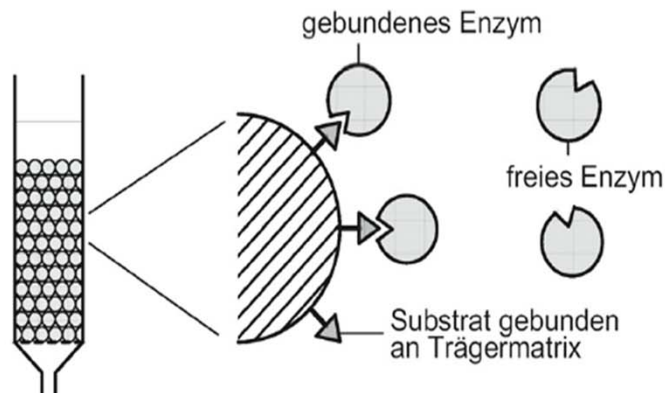


Abb. aus "Chemie erleben"; Wawra, Dolznig und Müllner, Facultas / UTB Verlag, 2003



## Ionenaustauscher:

z.B. Austausch der  $\text{Na}^+$ -Ionen gegen  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen, anschließend Elution von  $\text{Ca}^{++}$  mit Lösung mit hoher  $\text{Na}^+$ -Konzentration

## Affinitätschromatographie:

z.B. Reinigung eines Enzyms aus einer komplexen Mischung von Proteinen



## 4. Elektrophorese

Die Trennung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld.



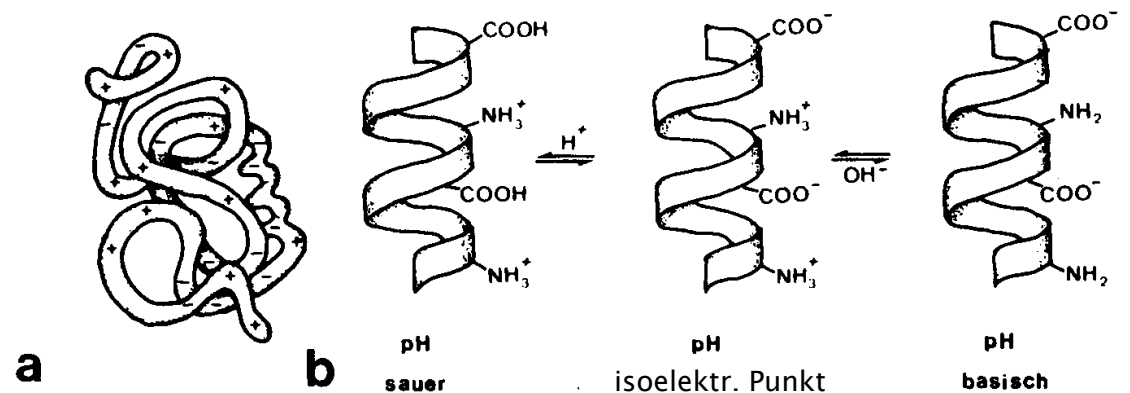
# Trennung und quantitative Analyse der Serumproteine

Voraussetzungen:

- Serumproteine müssen positiv oder **negativ** geladen sein.
- richtige Wahl des Puffers !
- Trägermaterial (analog zur stationären Phase)
- Gleichstromquelle

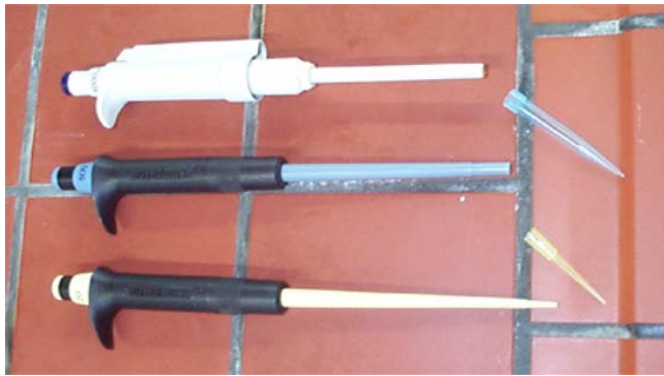
# Welchen pH-Wert muss die Pufferlösung haben, wenn die Proteine zur Anode wandern sollen?

- pI (Serumproteine) ~ 5
- Anode = + Pol
- Kathode = - Pol
- Puffer soll  $\text{pH} > 5$  sein, also in der Praxis bei 9 liegen



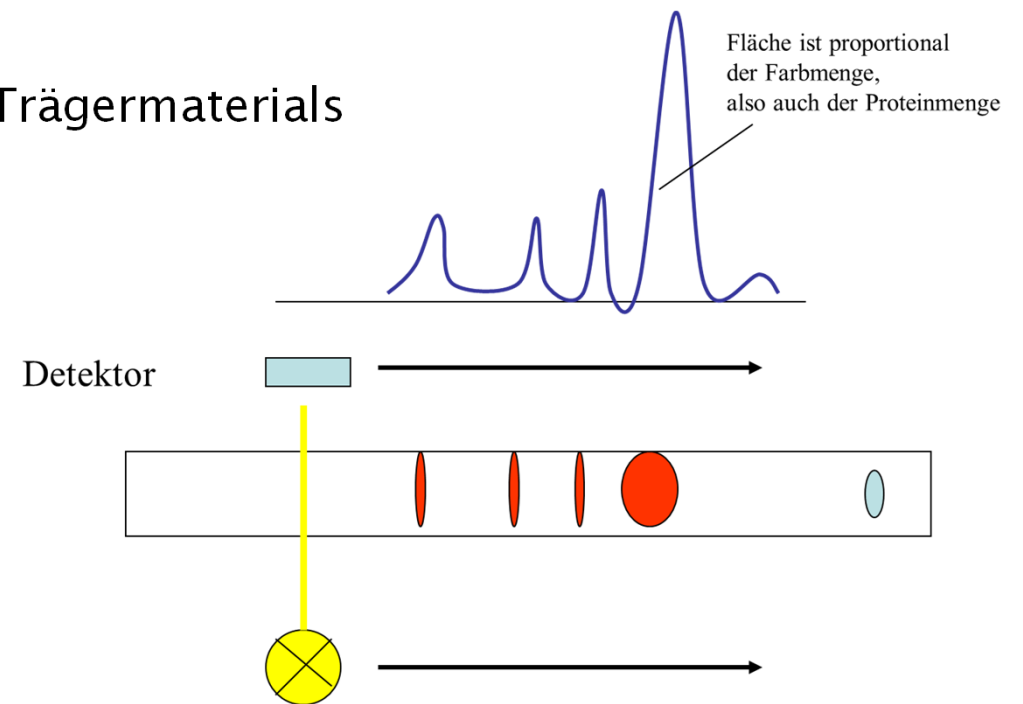
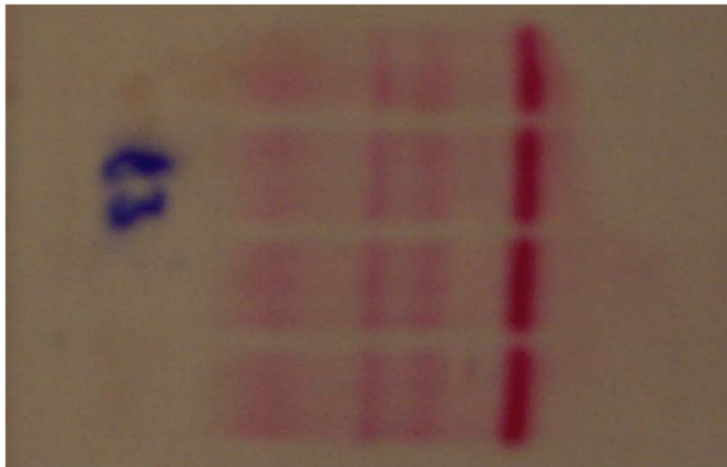
# Elektrophorese - Durchführung

Vorbereitung – Pipettieren kleiner Volumina – Proben auftragen

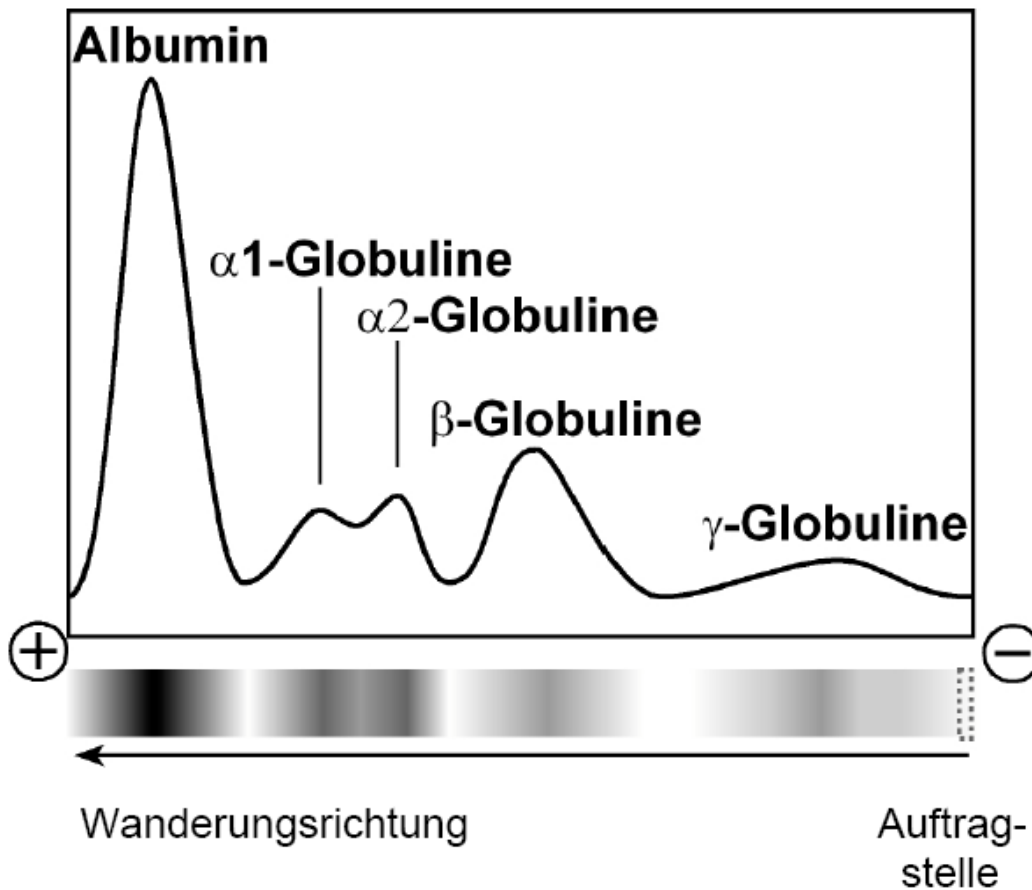


# Nach der Elektrophorese

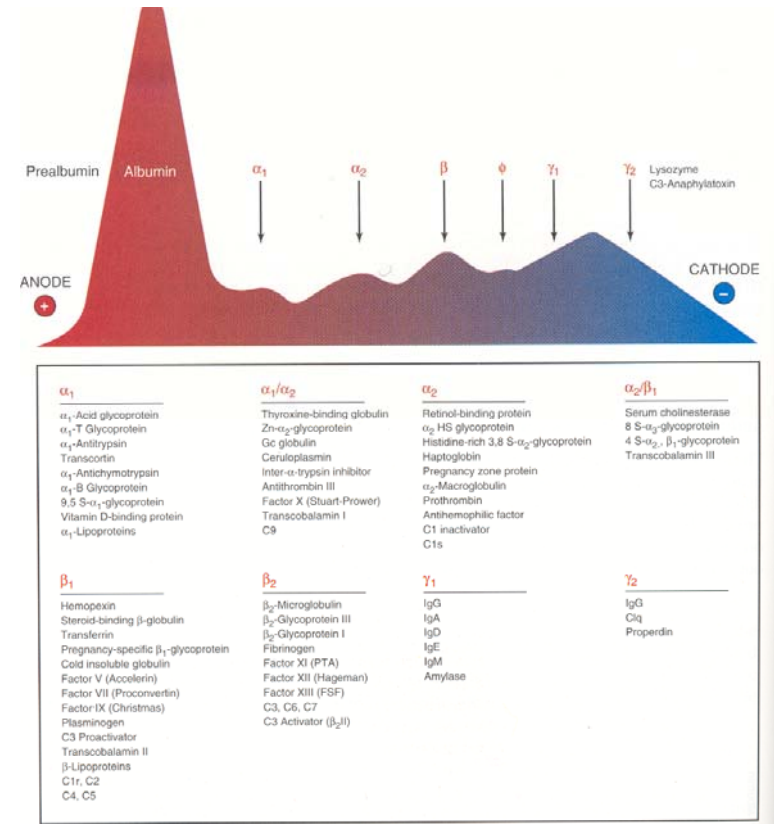
- Färben der Proteine
- Trägermaterial durchsichtig machen
- Densitometrische Auswertung
- Messen der Farbstoffdichte entlang des Trägermaterials



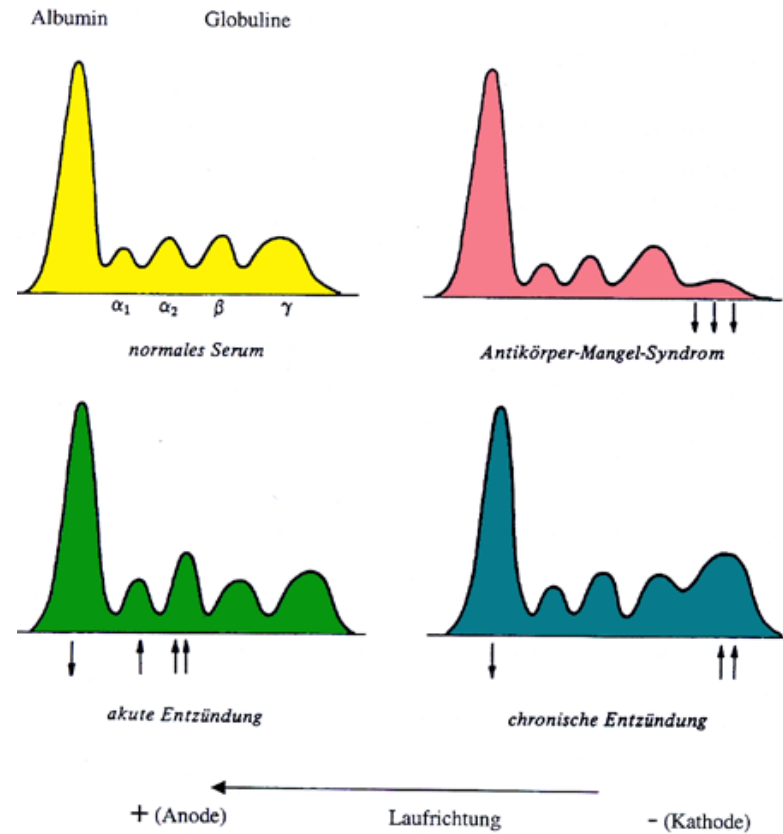
# Elektropherogramm



Chemie erleben Wawra et al.



# Diagnostische Aussagemöglichkeiten:



# Computer-gesteuerte Diagnose Geräte und Roboter

