

Proteinreinigung

B2.3

Kursprotokoll – Josef Riedl (Gr. 7) – 11/2003

Allgemeines zur Arbeitsweise

Zur Reinigung der ATCase wurden in verschiedenen Schritten verschiedene spezifische Eigenschaften des Proteins benutzt: Verhalten bei Hitze, Löslichkeit in Gegenwart bestimmter Salzkonzentrationen, Reaktion auf veränderten pH-Wert, Elutionsverhalten bei Säulenchromatographie.

Während des gesamten Reinigungsprozesses mußten, da das Ziel eine Gewinnung des voll funktionsfähigen Proteins war, alle interessierenden Proben zum Schutz vor Hitzedenaturierung bei niedrigen Temperaturen aufbewahrt und behandelt werden. Außerdem wurde zur Stabilisierung von oxidierbaren SH-Gruppen Mercaptoethanol beigegeben.

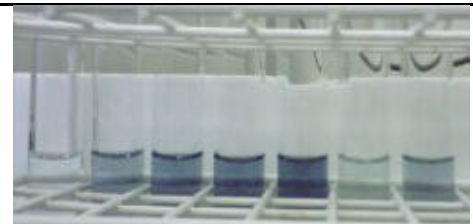
Spezielle Arbeitsvorschriften

Zur Überwachung des Reinigungsfortschritts mußten nach jedem erfolgten Schritt Proteingehalt, Gesamt-ATCase-Aktivität und spezifische Aktivität bestimmt werden. Zur Messung des Proteingehalts wurde der Standard-Test nach LOWRY verwendet. Zur Ermittlung der ATCase-Aktivität wurde ein spezieller Farbstest (basierend auf dem Originalartikel, Literaturangabe siehe Einleitung) angewandt. Die Vorschriften für beide Tests werden nachfolgend dem Reinigungsprotokoll vorangestellt.

Weitere mehrfach verwendete Arbeitsgänge waren die Gelelektrophorese mit SDS-PAGE, das Arbeiten mit DEAE-Sephadex und das Auskochen von Schläuchen für die Dialyse. Diese Vorschriften sollen ebenfalls aus dem Haupttext ausgegliedert werden und sind im Folgenden angegeben.

Proteintest nach LOWRY

Diese Methode zur Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe basiert, wie viele andere Proteintests, auf der Komplexbildung von Cu-Ionen mit den Peptidbindungen im Protein. Der Cu-Komplex zeigt eine blaue Färbung. Im Falle des Lowry-Tests werden durch Redoxprozesse im Reaktionsgemisch, an denen Tyr/Trp-Reste, Cu²⁺ und Cu⁺ sowie Wolframate und Molybdate beteiligt sind, farbige Verbindungen gebildet.



Lösungen:

(L-X) Folin-Ciocalteu-Lsg 2N

(L-A) Natriumcarbonat 3% (w/v) in 0,1N NaOH

(L-B) K/Na-Tartrat 4% (w/v) in Wasser

(L-C) Kupfersulfat x 5 H₂O 2% (w/v) in Wasser

(L-Y) Blaue Lowry-Lösung: je 1 ml (L-B), (L-C), ad 100 ml mit (L-A)

(L-S) Serumalbuminlösung 1 mg/ml

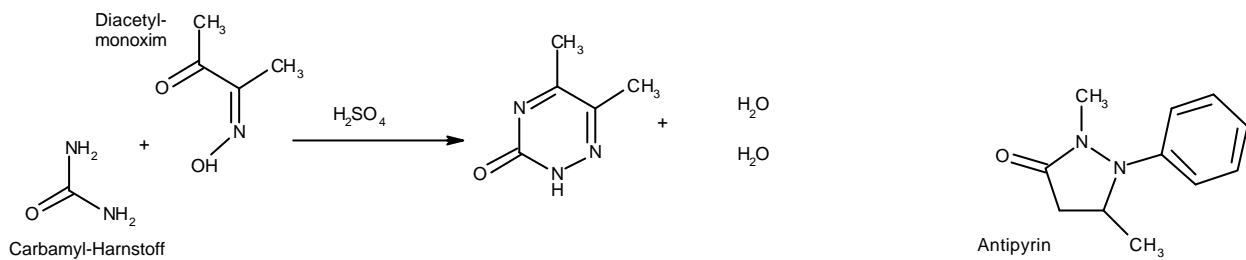
(L-P) Probenverdünnungspuffer: Imidazolpuffer 50mM, pH 7,5

Jeweils 2.5 ml Lowry-Lösung wurden in Reagenzgläsern vorgelegt. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden zu fünf Ansätzen 0, 50, 100, 150, 200 µl Serumalbuminlösung gegeben. In weiteren Ansätzen wurden stattdessen 10 und 50 µl (abweichende Volumina sind angegeben) der zu bestimmenden Probe (ggf. mit Puffer (L-P) verdünnt) eingesetzt. Alle Ansätze wurden mit Wasser auf 2.7 ml ergänzt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurden 100 µl Folin-Ciocalteu-Lösung (L-X) zugegeben. Die sofort auftretende grün-blaue Färbung wurde nach 30-60 min Entwicklungszeit bei Raumtemperatur photometrisch bei 578 nm vermessen. Die Menge des eingesetzten Proteins wurde durch Interpolation anhand der Eichgeraden bestimmt.

Aktivitätstest für ATCase (Nachweis von Carbamyl-Aspartat)

Der Aktivitätstest beruht auf dem quantitativen Nachweis des Reaktionsprodukts Carbamyl-Aspartat. Zur Analyse dieser Verbindung (und bestimmter Analoga wie Carbamylharnstoff) wurde ein Test entwickelt, an dem als wirksame Verbindungen ein Diacetylmonoxim-Carbamylharnstoff-Kondensationsprodukt (links) und

Antipyrin (rechts) beteiligt sind. Der weitere Mechanismus, der zu einer typischen Gelbfärbung führt, ist ungeklärt.



Lösungen:

(A-1) Serumalbumin-Puffer

5 mg/ml Serumalbumin + 50 mM Tris-HCl pH 7.0 + 1 mM Merc

(A-2) Kaliumphosphatpuffer 1 M, pH 7.0

K₂HPO₄ titriert mit KH₂PO₄

(A-3) Aspartatlösung: 346 mg NaAsp in 5 ml H₂O, Neutralisieren mit wenigen Tropfen 0.1 N NaOH, Wasser ad 10 ml

(A-4) Carbamoylphosphatlösung 0.08 M

(A-5) Schwefelsäure-Antipyrin-Lösung: 25 ml H₂O + 25 ml H₂SO₄ konz. (ACHTUNG)

nach Abkühlen + 0.5 g Antipyrin

(A-6) Diacetylmonoximlösung 0.2 g in 50 ml H₂O

(A-M) Kaliumphosphat-Aspartat-Mix aus (A-2) und (A-3), 1:1

(A-S) Stop-Mix aus (A-5) und (A-6), 2:1

In einem Reagenzglas wurden 200 µl Mix (A-M) vorgelegt und 100 µl Enzym/Probe zugegeben. Nach 5 min Vorwärmen im 28°C-Wasserbad wurde durch Zugabe von 100 µl Carbamylphosphat (A-4) die Reaktion gestartet und weitere 10 min bei 28 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung in ein vorbereitetes Szintfläschchen mit 2 ml Stop-Mix (A-S) gegeben und dieses bei 60 °C im Trockenschrank für 2 h unter Lichtschutz inkubiert. Die dann auftretende Gelbfärbung wurde nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur im Photometer bei 466 nm vermessen. Für die Umrechnung gilt: 1 Einheit E(466) = 4.5E-7 mol Carbamyl-Asp. Für die ATCase-Aktivität ist definiert: 1 Unit = 1 µmol CarbamylAsp / h.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden Standardapparaturen verwendet. Sammelgel und Trenngel hatten folgende genaue Zusammensetzung:

Trenngel (AA ca. 15%)

Tris-Puffer 1 M, pH 8.8	3.05	ml
Wasser	130	µl
SDS 10%	80	µl
TEMED	165	µl
Acrylamid 30%	3.66	ml
Ammoniumpersulfat 15 mg/ml	220	µl

Sammelgel (AA ca. 6%)

Tris-Puffer 1 M, pH 6.8	330	µl
Wasser	1.53	ml
SDS 10%	28	µl
TEMED	55	µl
Acrylamid 30%	430	µl
Ammoniumpersulfat 15 mg/ml	110	µl



Folgende Lösungen wurden außerdem benötigt:

(G-S) Proteinstandard, mit BSA (66 kD), OA (45 kD), GAP-DH (36 kD), Carboanhydrase (29 kD), Trypsinogen (24 kD), Trypsininhibitor (20 kD), α -Lactalbumin (14.2 kD)

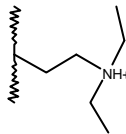
(G-P) Elektroden-Puffer zum Füllen der Kammer: 1 l Wasser mit 3.03 g Tris, 14.41 g Gly, 1.0 g SDS

(G-C) Coomassie-Blau, Färbelösung für Proteine

(G-F) Fixierer/Entfärber: HAC techn. 70 ml, Methanol 300 ml, Wasser 630 ml

Zur Entwicklung wurden die Gele entnommen, 10 min in Fixierer (G-F) gelegt, 15 min in Coomassie-Blau (G-C) geschwenkt und dann in Entfärber gelegt. Zum Entfärben waren ca. 3 Durchgänge von je 20 min mit frischem Entfärber notwendig. Dann konnten die Gele im Geltdrockner endgültig haltbar gemacht werden.

Säulenchromatographie mit DEAE-Sephadex



Diethylaminethyl(DEAE)-Gruppen wirken als Anionenaustauscher. Sie werden chemisch an Sephadex gekoppelt, was ein leicht handhabbares Säulenmaterial für die Ionenaustauschchromatographie ergibt. 10 g DEAE-Sephadex wurden in 1 l Wasser gegeben. Nach 30 min wurde das aufgequollene Sephadex-Gel über einen Büchnertrichter abgesaugt und in 1 l NaOH (0.1 M) überführt. Nach weiteren 120 min wurde erneut abgesaugt und mit 1 l Säulenpuffer (0.1 M Imidazolpuffer pH 7.0 mit zusätzlich 0.35 M KCl) gewaschen. Das ablaufende Eluat wurde auf Neutralität geprüft. Nach dieser Äquilibrierung wurde das Säulenmaterial in Startpuffer (0.01 M Imidazolpuffer pH 7.0 mit 0.35 M KCl und 0.5 mM Mercaptoethanol) aufbewahrt. Das Gel setzte sich am Boden ab. Der Überstand wurde ca. alle 24h durch frischen Startpuffer ersetzt. Zum Auftragen auf die Säule wurden Gel und Überstand aufgewirbelt, so daß eine gleichmäßige Suspension entstand.

Überschüssiges und gebrauchtes Säulenmaterial wurde am Ende des Versuchs regeneriert, indem auf dem Büchnertrichter nacheinander mit jeweils 1-2 l NaCl-Lösung (1 M), NaCl-Lösung (2 M), Natronlauge (0.1 M) und Wasser (bis zur Neutralität) gewaschen wurde. Das Gel wurde dann zur Aufbewahrung in 50 mM NaCl mit 0.002% Hibitan (als Bakteriozid) überführt.

Vorbehandlung von Dialyseschläuchen

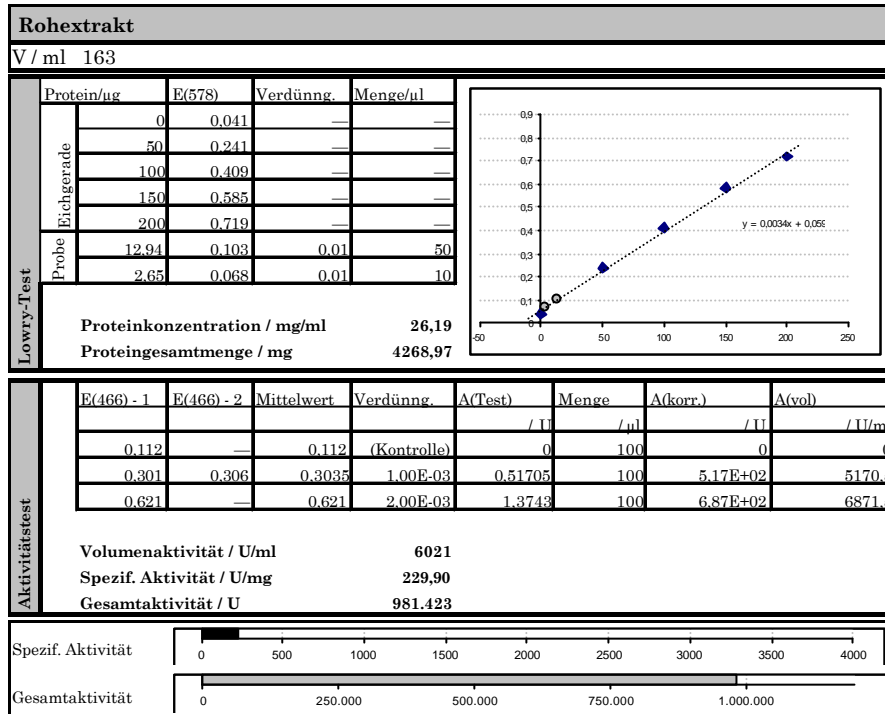
Es standen zwei verschiedene Schlauchtypen (Breite ca. 2 und 1 cm) zur Verfügung. Für eine Dialyse wurden ca. 12-18 cm Schlauch benötigt.

Zum Auskochen der Schläuche wurde eine Lösung aus Natriumhydrogencarbonat 0.2 M (zur Keimfreimachung) und EDTA 5 mM (zur Entfernung von störenden Metallionen) in Wasser verwendet. Die Dialyseschläuche wurden darin 5 min gekocht, mit dest. Wasser abgespült und dieser Vorgang noch zweimal wiederholt.

Die vorbehandelten Schläuche wurden bei 4°C in einer wässrigen Lösung von Natriumazid 0.02% aufbewahrt.

Ausgangspunkt der Reinigung : Rohextrakt

Vom Rohextrakt nach Aufschluß wurden folgende Daten ermittelt (die auch als Bezugswerte für spätere Ausbeutebestimmung dienen):



Schritt 1 – Hitzefällung

Das gesuchte Enzym ist relativ hitzestabil und fällt auch bei Temperaturen von 75°C nicht aus, wenn Salzkonzentration und pH-Wert angepaßt werden. Dadurch kann die ATCase mit dem Hitzeüberstand von einer Vielzahl anderer Proteine im Niederschlag getrennt werden.

Materialien, Substanzen, Puffer

(6) Tris-HCl-Puffer 0.1M, pH 9.2; mit Mercaptoethanol 1 ml/l und Ammoniumsulfat 3.6 M

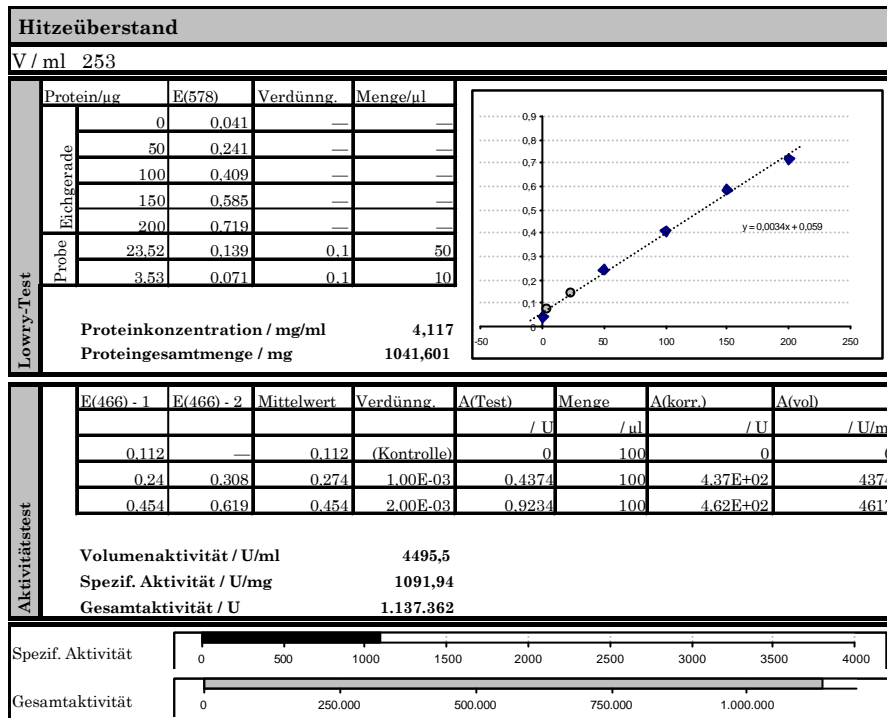
(7) Ammoniumsulfatlösung 0.9 M

Wasserbad

Durchführung

Der Rohextrakt (163 ml) wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und langsam XXX ml der Ammoniumsulfatlösung (6) (entspr. 35 ml auf 100 ml Rohextrakt, Endkonzentration XXX) zugegeben. Dadurch wurde eine festgelegte Ionenstärke und ein pH-Wert von ca. 8.0-8.5 erreicht. Die Lösung wurde in einem 75°C-Wasserbad auf ca. 72°C erwärmt (Überwachung durch Innenthermometer) und dort insgesamt 9 min belassen. Nach dem Abkühlen wurde der gebildete Niederschlag abzentrifugiert (ZF 20 min, 10000 g, 4°C). Der Überstand war nicht klar, sondern enthielt noch Flocken und wurde deshalb nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet aus dem ersten Zentrifugationslauf wurde mit Ammoniumsulfatlösung (7) gewaschen und die Suspension ebenfalls noch einmal zentrifugiert. Von allen Durchgängen wurden die Überstände zu **253 ml Hitzeüberstand** vereinigt.

Daten zum Hitzeüberstand



Schritt 2 – Erste Ammoniumsulfatfällung

Durch deutliche Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe einer fast gesättigten Ammoniumsulfatlösung wurde das gesuchte Protein ausgefällt. Der Niederschlag musste zur Entfernung der Ionen dialysiert werden.

Materialien, Substanzen, Puffer

(8) Ammoniumsulfatlösung 3.6 M, Zusatz Mercaptoethanol 0.02 M

(9) Dialyse-Vorbereitungspuffer: Imidazolpuffer 0.01 M, pH 7.0; EDTA 0.2 mM; Mercaptoethanol 2 mM

(10) Dialysepuffer: KCl-Lösung 0.35 M

Durchführung

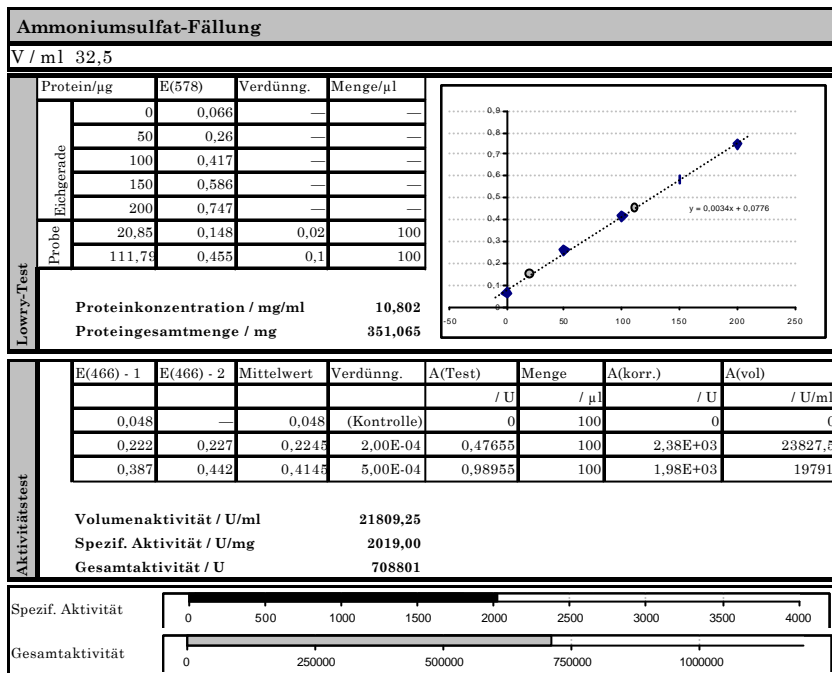
Zum Hitzeüberstand (252 ml) wurden im Eisbad tropfenweise insgesamt 219 ml der Ammoniumsulfatlösung (8) zugegeben (entspricht 87 ml auf 100 ml Hitzeüberstand; Endkonzentration 1.7 M). Die Lösung wurde 30 min stehengelassen und zeigte dann deutliche Trübung. Durch Zentrifugation (ZF 30 min, 10000 rpm, 4°C) wurde eine kleine Menge Niederschlag gewonnen. Der Überstand (theoretisch ATCase-frei) wurde zur Kontrolle aufbewahrt. Das Pellet wurde in 15 ml Puffer (9) gelöst und in einem abgekochten Dialyseschlauch über Nacht gegen 2 l Dialysepuffer (10) dialysiert.

Das Dialysat wurde zentrifugiert (ZF 30 min, 10000 g, 4°C), der Überstand abgenommen, das Pellet in 10 ml Dialysepuffer resuspendiert, nochmals zentrifugiert (ZF wie oben) und der Überstand mit dem vorhergehenden vereinigt.

Es wurden in diesem Schritt **32.5 ml Dialysat nach Ammoniumsulfatfällung** gewonnen.



Daten zu Proteingehalt und Aktivität



Beim oben erwähnten Überstand wurden folgende Werte gemessen :

Ammoniumsulfat-Überstand							
V / ml 450							
E(466) - 1	E(466) - 2	Mittelwert	Verdünnung	A(Test)	Menge	A(korr.)	A(vol)
				/ U	/ µl	/ U	/ U/ml
0,048	—	0,048	(Kontrolle)	0	100	0	0
0,076	0,078	0,077	1,00E+00	0,0783	100	7,83E-02	0,783
Volumenaktivität / U/ml				0,783			
Gesamtaktivität / U				352			

Es war also im Überstand tatsächlich ATCase nur in kleinen Spuren vorhanden (350 U). Ungewollte Verluste sind bei diesem Schritt nicht aufgetreten.

Schritt 3 – DEAE-Säulenchromatographie

Materialien, Substanzen, Puffer

- Chromatographiesäule, d = ca. 12 mm, h = ca. 150 mm
- DEAE-Sephadex-Säulenmaterial
- (11) Startpuffer: 0.01 M Imidazolpuffer pH 7.0 mit 0.35 M KCl und 0.5 mM Mercaptoethanol
- Fraktionskollektor mit Plastikröhrchen für ca. 30-40 Fraktionen
- UV-Photometer

Durchführung

Die Säule wurde mit 80 ml DEAE-Sephadex-Suspension gefüllt. Nach einigen Minuten Absetzen und einigen Minuten mit geöffnetem Ablauf ergab sich ein Bettvolumen von ca. 40 ml. Die Säule wurde mit 10 ml Startpuffer (11) und nochmals mit ca. 100 ml Startpuffer (11) aus einem vorbereiteten Reservoir gewaschen.

Das gesamte Dialysat wurde vorsichtig aufgetragen und der Fraktionssammler (mit 2.5 ml pro Fraktion) gestartet. Nach mehrmaligem manuellem Nachwaschen mit je 2 ml Startpuffer wurden 5 ml Puffer auf die Säule gegeben und mit Puffer aus dem Reservoir weiter eluiert.



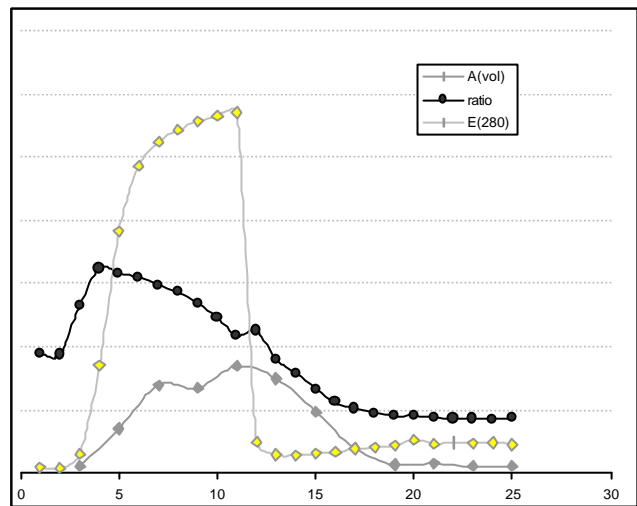
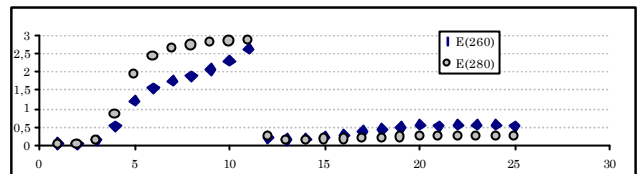
Auf diese Weise wurden insgesamt 25 Fraktionen gesammelt. Von diesen (jede 2. Fraktion) wurde im UV-Photometer die Absorption bei 280 nm, bei 260 nm und das Verhältnis gemessen. In einigen Fällen (Fraktionen 12-25) wurde der Messbereich überschritten und es musste eine 1:10-Verdünnung der Proben gemessen werden.

Die Daten gaben einen Hinweis auf die Gesamtproteinmenge der jeweilige Fraktion (E280) und auf den Anteil der ATCase, die bei 280 nm stark absorbiert, während das Maximum bei bekannten Verunreinigungen bei 260 nm liegt. Ein E280/E260-Wert > 1 bei nicht zu kleinem E280 zeigte also einen hohen Anteil ATCase an.

Im nächsten Schritt wurden mit den einzelnen Fraktionen Aktivitätstests durchgeführt (von jeder 2. Fraktion ab Fraktion 3 nach dem photometrischen Befund).

Aus beiden Messungen ergaben sich insgesamt folgende Datensätze und folgende Diagramme (y-Achse nicht maßstäblich) :

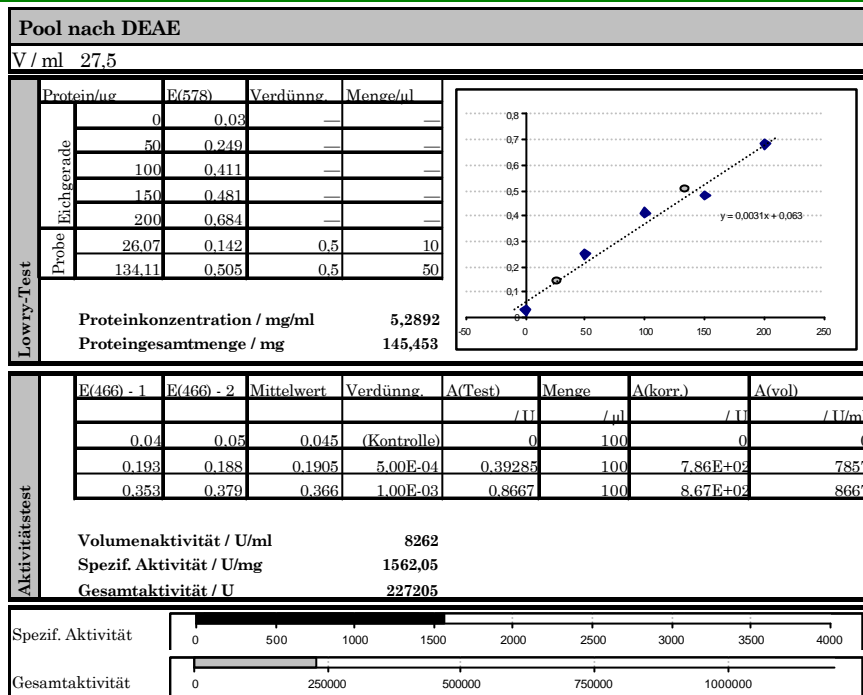
#	E(280)	E(260)	Ratio	Akt.: E(466)	A(Vol) / U/ml	A(gesamt) / U
1	0.049	0.052	0.941	—	—	—
2	0.045	0.048	0.937	—	—	—
3	0.151	0.144	1.326	0.056	270	675
4	0.853	0.526	1.618	—	—	—
5	1.91	1.206	1.583	0.353	8289	20722,5
6	2.426	1.563	1.552	—	—	—
7	2.616	1.757	1.488	0.697	17577	43942,5
8	2.71	1.892	1.432	—	—	—
9	2.78	2.066	1.345	0.674	16956	42390
10	2.824	2.287	1.234	—	—	—
11	2.853	2.618	1.089	0.848	21654	54135
12	0.247	0.219	1.128	—	—	—
13	0.147	0.163	0.901	0.75	19008	47520
14	0.142	0.179	0.793	—	—	—
15	0.158	0.238	0.663	0.487	11907	29767,5
16	0.166	0.296	0.56	—	—	—
17	0.194	0.379	0.512	0.201	4185	10462,5
18	0.208	0.436	0.476	—	—	—
19	0.22	0.485	0.453	0.068	594	1485
20	0.263	0.571	0.46	—	—	—
21	0.233	0.527	0.442	0.077	837	2092,5
22	0.243	0.562	0.432	—	—	—
23	0.238	0.551	0.431	0.054	216	540
24	0.243	0.564	0.43	—	—	—
25	0.228	0.523	0.435	0.055	243	607,5



Unter Berücksichtigung des Zieles möglichst hoher Ausbeute und gleichzeitig hoher Reinheit wurde entschieden, die Fraktionen XXX-XXX anhand aller Daten als ATCase-Peak zu werten. Diese Fraktionen wurden zu insgesamt **27.5 ml Pool nach DEAE** vereinigt.

Die Standard-Tests ergaben folgende Resultate:

TTTTT



Schritt 4 – Zweite Ammoniumsulfatfällung

Zur weiteren Reinigung wurde eine nochmalige Ammoniumsulfatfällung - im Wesentlichen analog dem früheren Schritt, jedoch mit deutlich erhöhter Ionenkonzentration - durchgeführt.

Materialien, Substanzen, Puffer

(12) Ammoniumsulfatlösung 3.6 M

(13) Kaliumphosphatpuffer 0.04 M, pH 7.0 mit 0.2 mM EDTA und 2 mM Mercaptoethanol

Durchführung

Zu den 27.5 ml Lösung aus dem DEAE-Pool wurden tropfenweise insgesamt 41.25 ml der Ammoniumsulfatlösung (12) (entspricht 150 ml auf 100 ml DEAE-Pool, Endkonzentration 2.16 M) gegeben. Innerhalb von 30 min Rühren bildete sich eine deutliche Trübung. Die gesamte Flüssigkeit wurde zentrifugiert (ZF 10 min, 14000 rpm, 4°C). Der Überstand (theoretisch ATCase-frei) wurde zur Kontrolle aufbewahrt, das Pellet in 5 ml K-P-Puffer (13) resuspendiert.

Von einer kleinen Probe wurden wiederum Aktivität und Proteinmenge bestimmt.

Schritt 5 – pH-Fällung

Durch gezielte Fällung der ATCase bei pH 5.9 werden nochmals andere Proteine abgetrennt. Dieser Schritt wurde hier mit der (nach der Ammoniumsulfat-Fällung zum Entfernen der Ionen notwendigen) Dialyse verbunden.

Materialien, Substanzen, Puffer

(14) Dialyse-Lösung: Kaliumphosphatpuffer 0.01 M, pH 5.9

(15) Kaliumphosphatpuffer 0.04 M, pH 7.5 mit 2 mM Mercaptoethanol

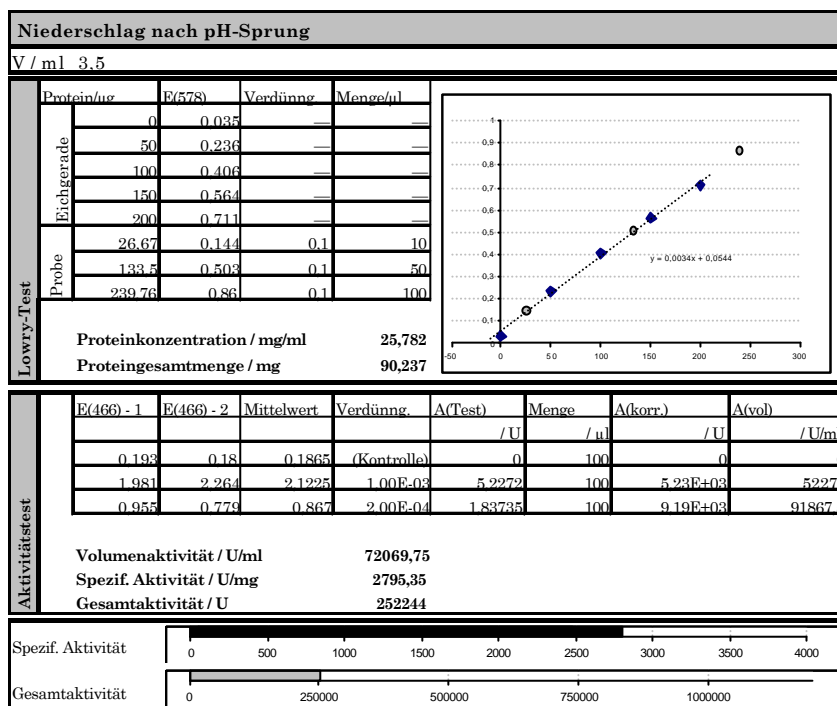
Durchführung

Der Überstand aus der zweiten Ammoniumsulfat-Fällung wurde in einen Dialyseschlauch überführt und gegen 2 l der Lösung (14) dialysiert. Die Dialyse fand im Kühlraum (4°C) für insgesamt 36 h statt, wobei die Dialyselösung zweimal gegen 1.5 l frische Lösung ausgetauscht wurde.

Nach Ablauf der 36 h wurde der entstandene Niederschlag im Schlauch resuspendiert und die gesamte Flüssigkeit zentrifugiert (ZF 10 min, 15000 rpm, 4°C).

Der Überstand (theoretisch ATCase-frei) wurde entnommen und die Aktivität zur Kontrolle bestimmt. Der Niederschlag wurde in 3.5 ml K-P-Puffer (15) vorsichtig resuspendiert. Der pH-Wert wurde dadurch wieder auf ein neutrales Niveau gebracht. Die Suspension wurde nochmals zentrifugiert (ZF 10 min, 10000 rpm, 4°C), das Pellet verworfen und der Überstand aufbewahrt. Dieser Überstand entsprach der reinen ATCase-Lösung. Es mußte nun noch eine Dialyse durchgeführt werden, die aber je nach Weiterverwendung unterschiedlich geplant werden mußte.

Zunächst wurde aber von den **3.5 ml nach pH-Sprung** eine Probe entnommen und Aktivität und Protein bestimmt.



Schritt 6 – Abschließende Dialyse je nach Weiterverwendung

Materialien, Substanzen, Puffer

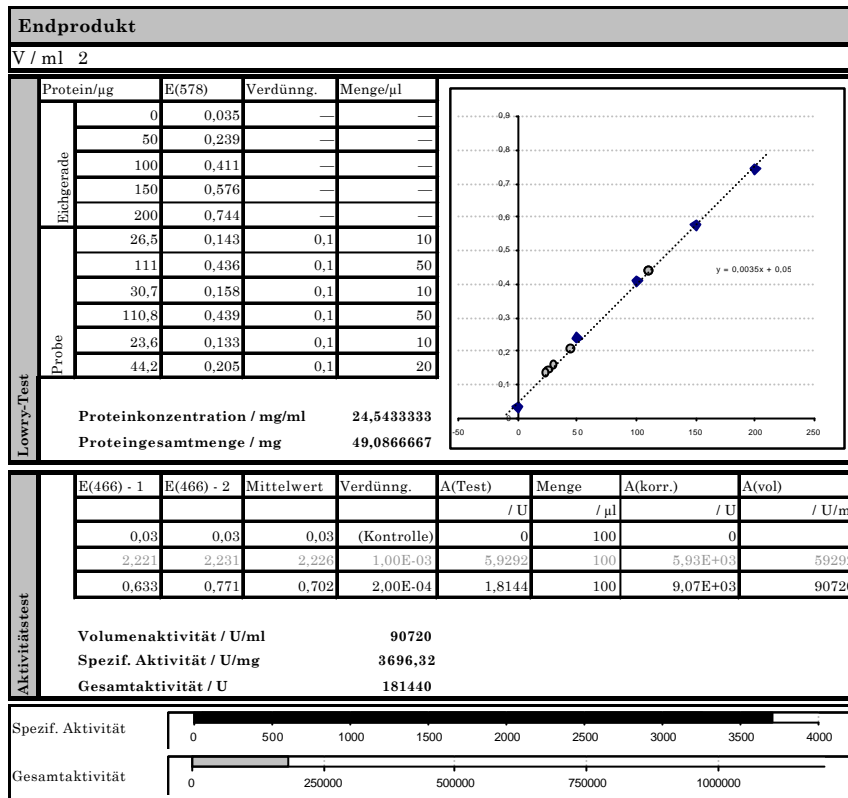
(16) Dialysepuffer I: Kaliumphosphatpuffer 0.04 M, pH 7.0

(17) Dialysepuffer II: Kaliumphosphatpuffer 0.04 M, pH 7.0 mit 2 mM Mercaptoethanol und 0.2 mM EDTA

Durchführung

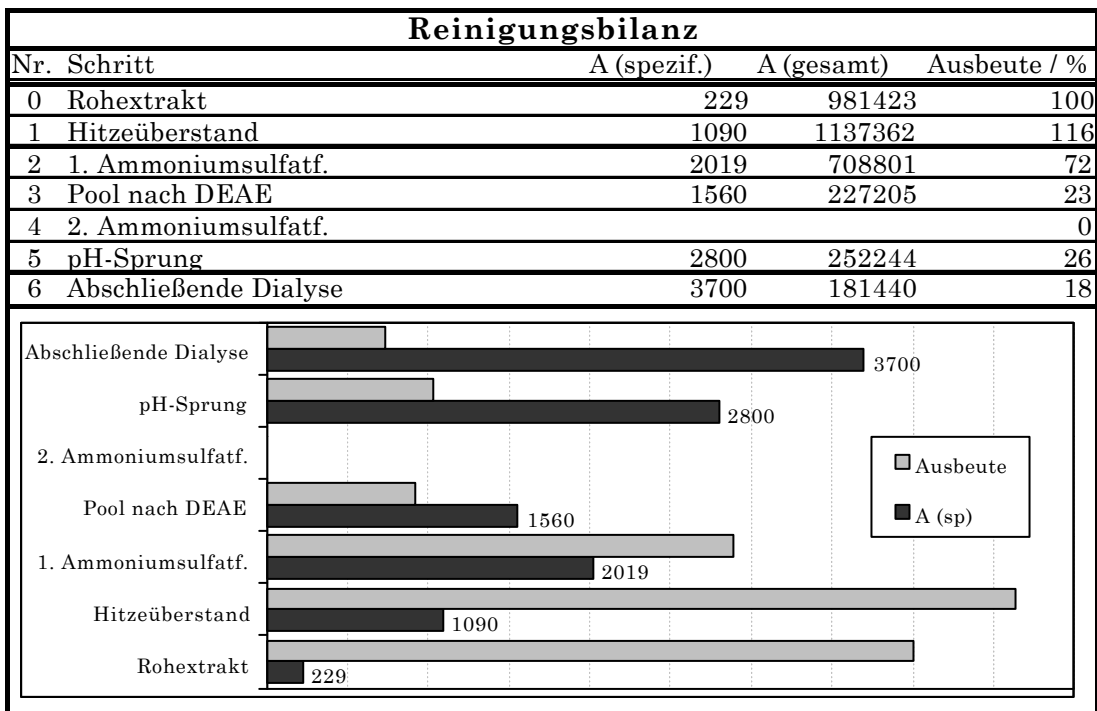
1.5 ml des Überstands aus dem letzten Schritt wurden über Nacht gegen 2 l der Lösung (16) dialysiert (ohne Mercaptoethanol, das bei der Untereinheitentrennung störend wäre). Der Rest wurde in einem weiteren Gefäß ebenfalls über Nacht gegen den Dialysepuffer II (17, mit Mercaptoethanol) dialysiert.

Das im letzteren Ansatz gewonnene Dialysat entspricht **2 ml isolierter ATCase** am Ende des Reinigungsprozesses. Hier wurden schließlich Aktivität und Proteingehalt des Endprodukts bestimmt.



Bilanz der Reinigung

Der Erfolg der Reinigung läßt sich am besten an einem Diagramm veranschaulichen, in dem als Datenreihen die Gesamtaktivität (entsprechend der Absolutmenge an ATCase; hier werden möglichs geringe Verluste angestrebt) in % der Ausgangsgesamtaktivität (Ausbeute) und die spezifische Aktivität (entsprechend der Reinheit) aufgetragen sind.



Kontrolle der Reinigung durch SDS-PAGE

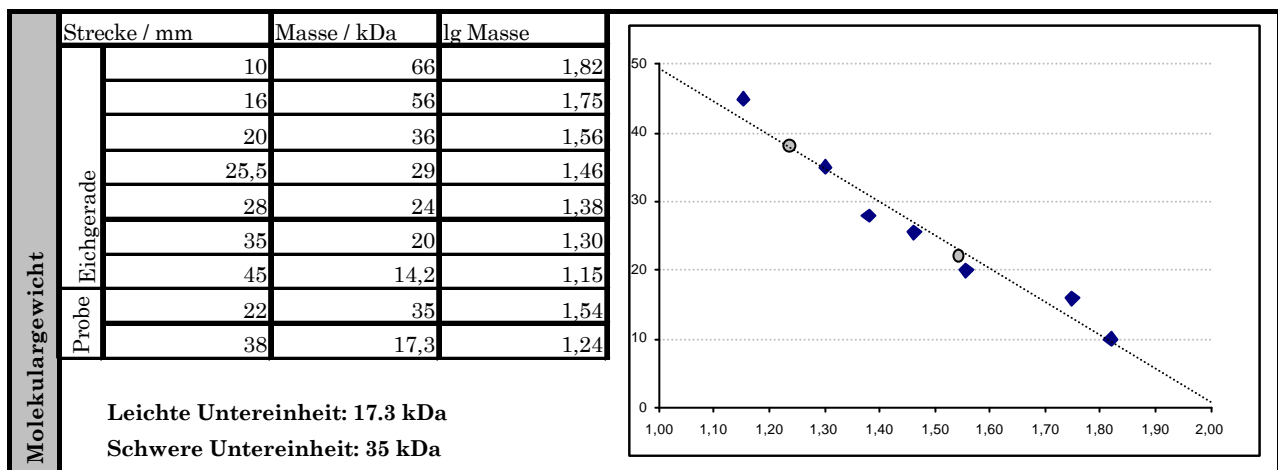
Der Effekt der Reinigung im Hinblick auf die tatsächlich isolierten und eliminierten Proteine wurde durch eine SDS-PAGE dokumentiert. Zu diesem Zweck waren während der Reinigung nach jedem Schritt Proben von 0.5 ml entnommen und eingefroren worden. Diese wurden nun (verdünnt auf 10 mg/ml) zusammen mit Protein-Standard auf ein SDS-Gel aufgetragen. Somit konnten die auftretenden Banden im Hinblick auf Lage und Intensität verglichen und identifiziert werden.

Nach einer Laufzeit von ca. 90 min bei 20 mV wurde das Gel fixiert, mit Coomassie-Blau gefärbt, entfärbt und getrocknet.

Die aufgetragenen Proben sind auf der Abbildung beschriftet.

Es fallen sofort zwei Banden auf, die mit jedem Schritt deutlicher auftreten und schließlich gegenüber allen anderen Proteinen dominieren. Es handelt sich dabei um zwei Untereinheiten der ATCase, die – offenbar erst durch die Einwirkung von SDS bei der Elektrophorese – getrennt wurden (dies wird in Teil B2.4 weiter untersucht). Bei genauerer Betrachtung sind diese Banden auch im Rohextrakt schon überdurchschnittlich vertreten. Das ist auf die Eigenheiten des verwendeten Bakterienstammes zurückzuführen, der permanent zu viel ATCase produziert.

Die Laufstrecke der Standard-Banden kann gegen den Logarithmus des entspr. Molekulargewichtes linear aufgetragen werden. Durch Interpolation erhält man für die beiden ATCase-Banden Molekulargewichte von 35 kDa (schwere Untereinheit) und 17.3 kDa (leichte Untereinheit).



Angemerkt werden muß auch das Auftreten einer dritten, schwachen Bande bei 27 kDa. Diese Bande gehört nicht zur ATCase und entspricht einem co-gereinigten Protein, das mit angereichert wurde. Die Identität dieses Proteins ist unbekannt.