



Lernlabor **Biologie**

Enzyme

Kinetik, Spektroskopie, Mikroskopie

Der Labortag

Enzyme sind Katalysatoren biologischer Systeme, indem sie Reaktionen starten oder beschleunigen. Nahezu alle heute bekannten Enzyme sind Proteine. Wie bedeutend Enzyme für das Leben sind, zeigt sich auch darin, dass etwa ein Viertel des menschlichen Genoms Enzyme codiert. Mit modernen Forschungsmethoden und -geräten wird die Enzymkinetik nach Michaelis-Menten anhand des Alkoholabbaus durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) aufgezeigt und näher charakterisiert.

Stationsübersicht:

Station 1:
Enzymatischer Lactoseabbau

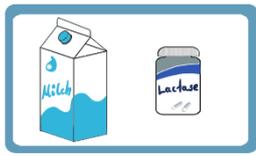
Station 2:
Absorptionsspektren von NAD⁺ und NADH

Station 3:
Isolation von ADH aus Hefezellen

Station 4:
Aktivitätsnachweis der ADH

Station 5:
Michaelis-Menten Kinetik der ADH

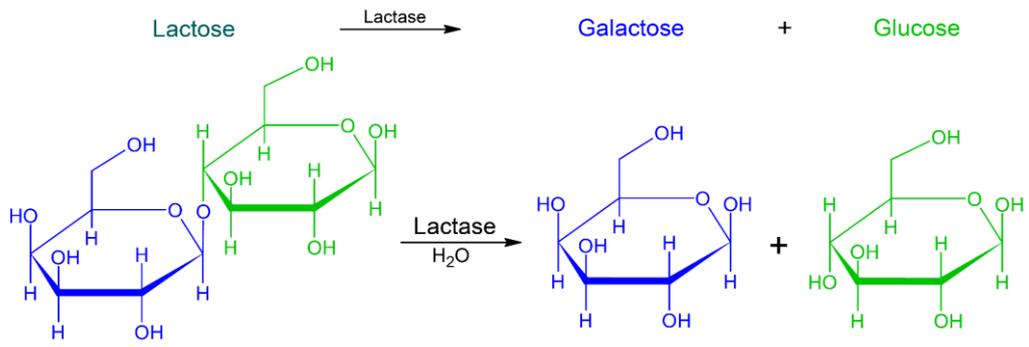
Station 6:
Färbung und Mikroskopie



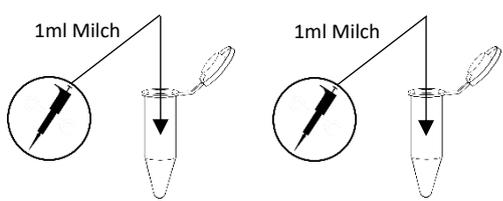
Station 1: Enzymatischer Lactoseabbau

In Deutschland sind ca. 15-20 % der Erwachsenen lactoseintolerant.

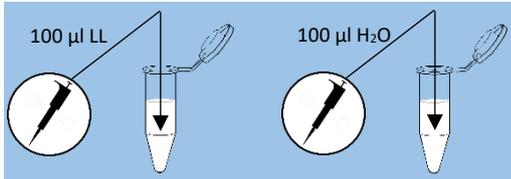
Dies bedeutet, dass sie den Milchzucker Lactose aufgrund fehlender oder verminderter Produktion des Enzyms Lactase nicht verwerten können. Um einer Lactoseintoleranz entgegenzuwirken kann Lactase in Form von Tabletten als Nahrungsergänzungsmittel eingenommen werden.



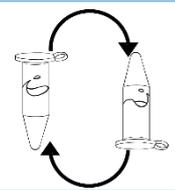
Aufgabe: Überprüfen Sie die enzymatische Aktivität der Lactase.



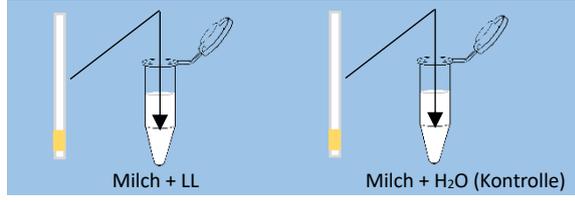
- Pipettieren Sie jeweils 1 ml Milch in zwei leere Eppendorfgefäße (Eppis)



- Geben Sie 100 µl Lactaselösung (LL) in eines der Eppis
- Geben Sie in das andere Eppi 100 µl H₂O als Kontrolle



- Mischen Sie die Proben vorsichtig, indem Sie die Eppis mehrfach auf den Kopf drehen



- Tauchen Sie in beide Proben jeweils ein Glucoseteststäbchen für ca. 15 Sekunden ein
- Warten Sie anschließend 60 Sekunden und lesen Sie den Teststreifen ab

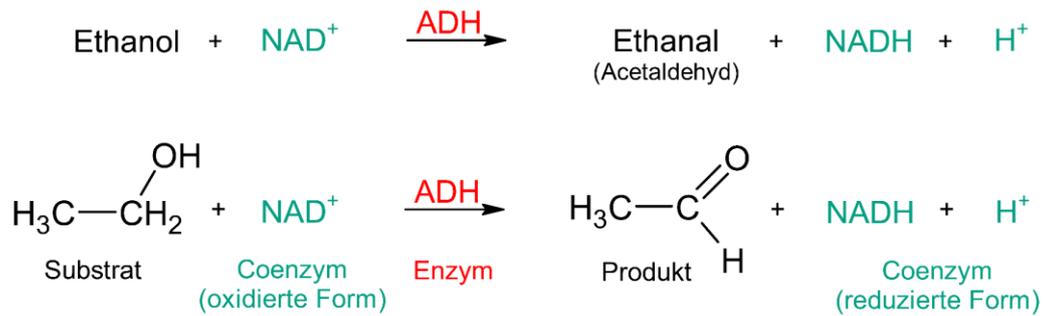


Auswertung: Markieren Sie die entsprechende Glucosekonzentration der Proben



Station 2: Aufnahme der Absorptionsspektren von NAD⁺ und NADH

Beim Ethanolabbau durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) ist das Coenzym Nicotin-adenindinucleotid (NAD⁺) beteiligt. Dieses wird während des Ethanolabbaus zu NADH + H⁺ reduziert, d.h. es nimmt Protonen und Elektronen auf.



Das Coenzym NADH absorbiert Licht bestimmter Wellenlängen und lässt sich somit photometrisch nachweisen. Da Ethanal und NADH im Verhältnis 1:1 gebildet werden, können über die Messung der Absorption von NADH Rückschlüsse auf die Bildung des Produkts Ethanal gezogen werden.

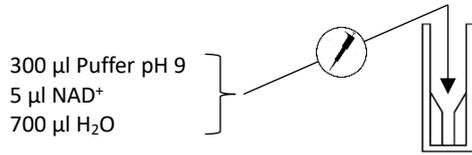
Zur Bestimmung der optischen Eigenschaften von NAD⁺ und NADH werden Absorptionsspektren von beiden Molekülen im Wellenlängenbereich zwischen 240 – 380 nm aufgenommen.

Bei Messungen im Photometer werden als Reaktionsgefäße Küvetten verwendet, um eine optimale Lichtdurchlässigkeit zu gewährleisten.

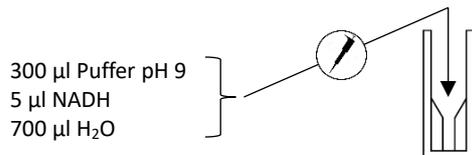
Hinweis: Küvetten nur im oberen Bereich anfassen!



Aufgabe: Erstellen Sie für das Coenzym NAD^+ und seine reduzierte Form NADH jeweils ein Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich zwischen 240 – 380 nm mit Hilfe des Photometers.

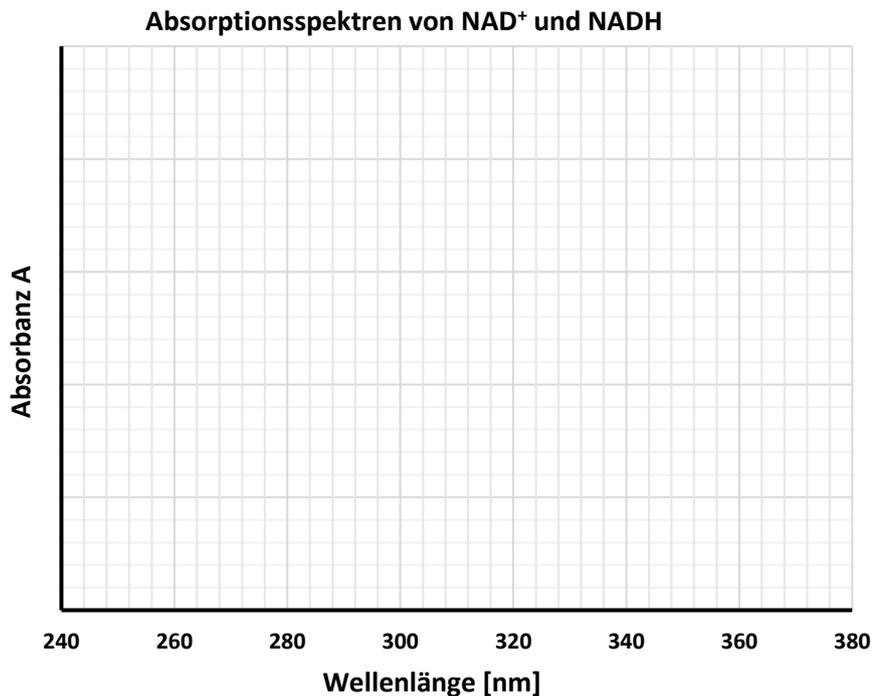


- Für die Gruppen 1 und 3:**
- Pipettieren Sie in eine Küvette 300 μl Puffer pH 9, 700 μl VE- H_2O und 5 μl NAD^+ (liegt auf Eis, farbiges Eppi)



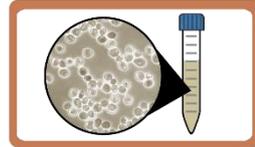
- Für die Gruppen 2 und 4:**
- Pipettieren Sie in eine andere Küvette 300 μl Puffer pH 9, 700 μl VE- H_2O und 5 μl NADH (liegt auf Eis, farbiges Eppi)

- Nehmen Sie mit Hilfe des Photometers von beiden Molekülen ein Absorptionsspektrum auf
Die Handhabung des Geräts erfolgt durch einen Betreuer.
- Markieren Sie im Diagramm die Maxima und Minima der Messwerte
- Skizzieren Sie die Kurvenverläufe der beiden Absorptionsspektren



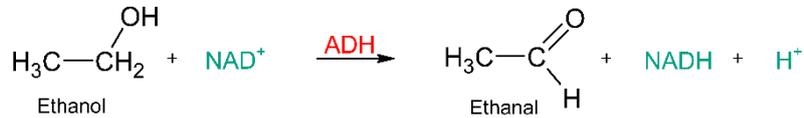
- Notieren Sie die Wellenlängen der Absorptionsmaxima von NAD^+ und NADH
 NAD^+ : Absorptionsmaxima bei _____ nm
 NADH : Absorptionsmaxima bei _____ nm

Ein Absorptionsmaximum von NADH ist spezifisch für dieses Molekül. Nutzen Sie diese Wellenlänge, um die NADH -Entstehung beim Alkoholabbau photometrisch zu verfolgen.



Station 3: Isolation von ADH aus Hefezellen

Das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) katalysiert den ersten Schritt des Alkoholabbaus in vielen Organismen. Ethanol wird durch diese Reaktion zu Ethanal oxidiert.



Aufgabe: Isolieren Sie die Alkoholdehydrogenase aus Hefezellen für weitere Untersuchungen

- Wiegen Sie 1 g Trockenhefe ab
- Lösen Sie die Trockenhefe in 5 ml Na₂HPO₄-Lösung (100 mM) in einem 15 ml-Falcontube

- Vortexen Sie die Lösung Ihres Falcontubes
- Beschriften Sie das Falcontube mit ihrer Gruppennummer (siehe Arbeitsplatz)

Schüttler

- Stellen Sie das Falcontube für mindestens 20 min in den Schüttler
In diesem Schritt werden die Zellen lysiert, sodass die ADH frei in der Suspension vorliegt.

- Nehmen Sie das Falcontube aus dem Schüttler und pipettieren Sie jeweils 1 ml der Suspension in zwei Eppis
- Beschriften Sie die Eppis mit Ihrer Gruppennummer

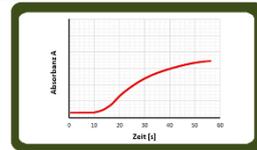
5 min
zentrifugieren

- Zentrifugieren Sie die Ansätze für 5 min

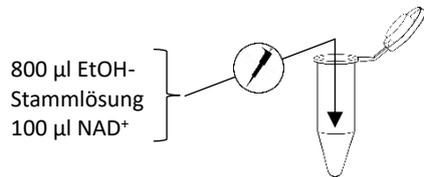
500 µl 500 µl } flüssiger Überstand

- Pipettieren Sie aus jedem der beiden Eppis 500 µl des flüssigen Überstands in ein steriles Eppi
Der Überstand (Rohextrakt) enthält die Alkoholdehydrogenase.
- Beschriftung mit Gruppennummer

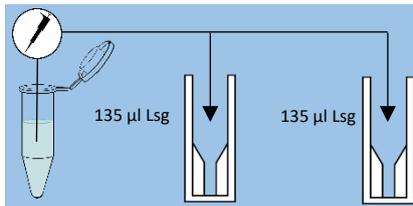
Station 4: Aktivitätsnachweis der ADH



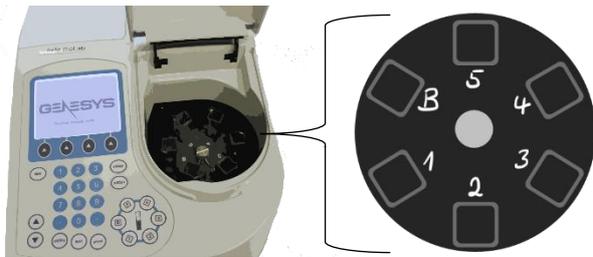
Aufgabe: Weisen Sie die Aktivität der Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Ihrem Rohextrakt (Station 3) mittels Photometer nach. Der ADH-Nachweis erfolgt bei einer Ethanol (EtOH)-Konzentration von 400 mM.



- Pipettieren Sie 800 µl der EtOH-Stammlösung (500 mM) und 100 µl NAD⁺ (50 mM) in ein Eppi
- Vortexen Sie ihre Lösung

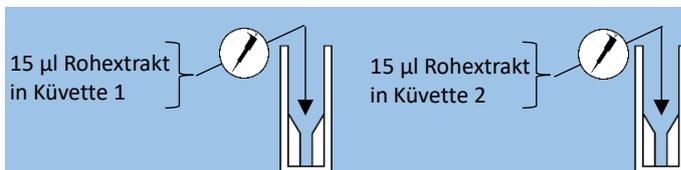


- Bereiten Sie zwei Küvetten vor:
- Pipettieren Sie je 135 µl der Lösung in die zwei Küvetten



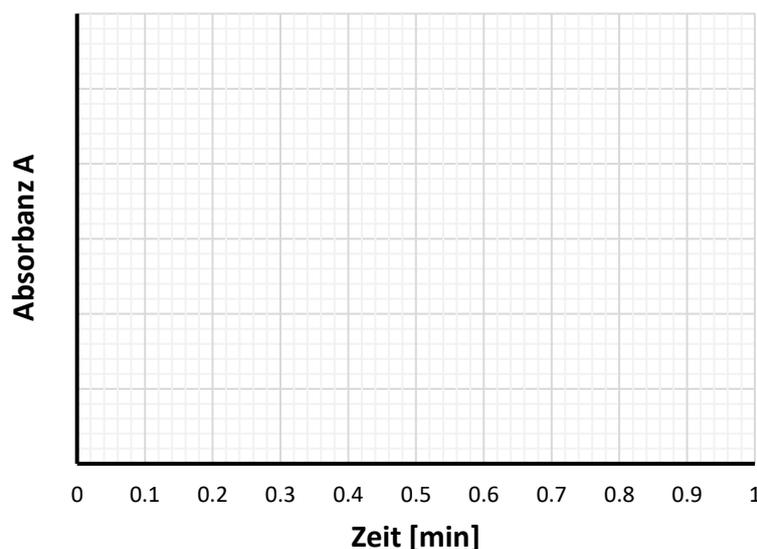
Messen Sie Ihre Ansätze im Photometer

- Sie benötigen am Photometer die vorbereiteten Küvetten und den zu überprüfenden Rohextrakt
- Ein Betreuer hilft Ihnen bei der Bedienung des Gerätes.*



- Stellen Sie die Küvetten ins Photometer
- Starten Sie die Reaktion indem Sie 15 µl des Rohextraktes, der die ADH enthält, in die Küvette pipettieren

Skizzieren Sie den Kurvenverlauf:



Station 5: Michaelis-Menten Kinetik



Einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der Kinetik von Enzymen lieferten Leonor Michaelis und Maud Menten 1913. Ihnen gelang es, die Enzymkinetik grafisch darzustellen. Bis heute sind die Ergebnisse ihrer Arbeit unter dem Begriff „Michaelis-Menten-Theorie“ bekannt.

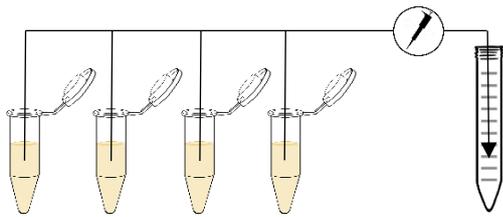
Aufgabe: Ermitteln Sie pro Photometer die Umsetzungsgeschwindigkeit der ADH in Abhängigkeit von der Ethanolkonzentration.



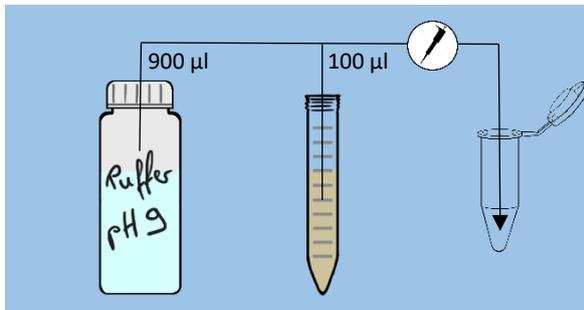
- Jede Gruppe misst die Enzymkinetik für **zwei** Ethanolkonzentrationen. Siehe Tabelle Seite 8.



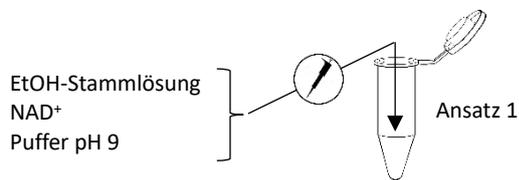
- Die Ergebnisse der Gruppen werden pro Photometer zusammengetragen, um die spezifische Enzymkinetik der ADH zu bestimmen.



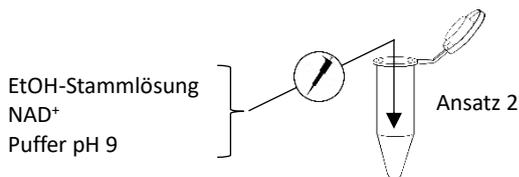
- Die Gruppen 1A – 4A und die Gruppen 1B – 4B erhalten einen gemeinsamen Rohextrakt aus Station 3 (gepoolter Rohextrakt)



- Verdünnen Sie pro Gruppe den gepoolten Rohextraktes 1:10
 - Pipettieren Sie dazu 900 µl Puffer pH 9 und 100 µl des gepoolten Rohextraktes in ein Eppi
 - Beschriften Sie das Eppi mit „ADH“ und Ihrer Gruppennummer

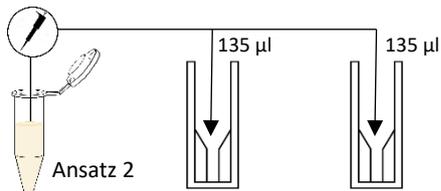
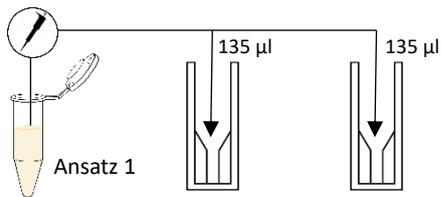


- Bereiten Sie zwei Ansätze mit den Ethanolkonzentrationen entsprechend der Gruppeneinteilung (siehe Tabelle) vor



- Beschriften Sie die Eppis mit Ihrer Gruppennummer und der entsprechenden Ethanolkonzentration

Gruppe	1A 1B	2A 2B	1A 1B	2A 2B	3A 3B	4A 4B	3A 3B	4A 4B
EtOH-Konzentration	1 mM	5 mM	10 mM	20 mM	40 mM	70 mM	100 mM	200 mM
Pipettieren Sie: ↓								
EtOH-Stammlösung (500 mM)	2 µl	10 µl	20 µl	40 µl	80 µl	140 µl	200 µl	400 µl
NAD⁺-Stammlösung (50 mM)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Puffer pH 9	798 µl	790 µl	780 µl	760 µl	720 µl	660 µl	600 µl	400 µl
Gesamt-volumen	Jeweils 900 µl							



- Bereiten Sie vier Küvetten vor
- Pipettieren Sie jeweils 135 µl aus Ansatz 1 in zwei Küvetten
- Beschriften Sie die Deckel mit der jeweiligen Ethanolkonzentration
- Pipettieren Sie jeweils 135 µl aus Ansatz 2 in zwei Küvetten
- Beschriften Sie die Deckel mit der jeweiligen Ethanolkonzentration



Messen Sie Ihre Ansätze im Photometer:

- Sie benötigen am Photometer die vorbereiteten Küvetten und den 1:10 verdünnten Rohextrakt mit der ADH
- Stellen Sie die Küvetten ins Photometer
- Starten Sie die Reaktion indem Sie 15 µl des Rohextraktes in die Küvette pipettieren

Ergebnissicherung:

Ansatz 1	Absorbanz Messwert 1 (M1)	Absorbanz Messwert 2 (M2)	Differenz (M2 – M1)
Ethanol-Konzentration: ____ mM			
Mittelwert der Absorbanz:			

Ansatz 2	Absorbanz Messwert 1 (M1)	Absorbanz Messwert 2 (M2)	Differenz (M2 – M1)
Ethanol-Konzentration: ____ mM			
Mittelwert der Absorbanz:			

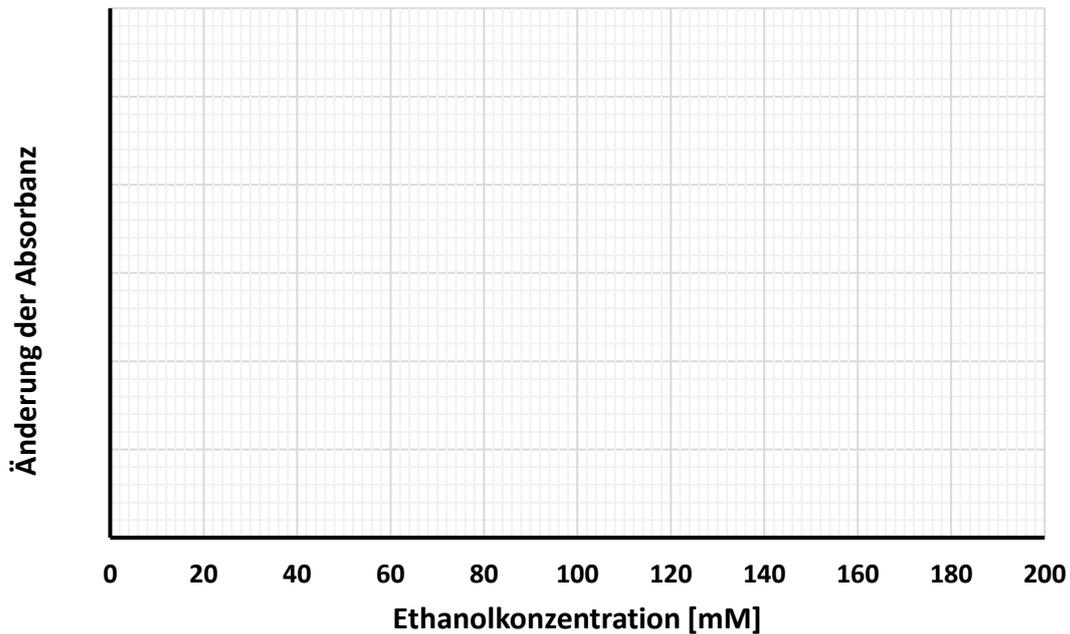
Ethanolkonzentration [mM]	Mittelwert der Absorbanz
1	
5	
10	
20	
40	
70	
100	
200	

- Notieren Sie die Mittelwerte der Absorbanz in der Tabelle
- Ergänzen Sie die Werte der übrigen Gruppen (1A – 4A bzw. 1B – 4B)
- Stellen Sie die Ergebnisse graphisch dar (Seite 10)
- Wählen Sie eine entsprechende Skalierung der y-Achse

Die Mittelwerte der Absorbanz entsprechen der Umsetzungsgeschwindigkeit der ADH.



Graphische Darstellung:



Digitale Datenauswertung

Zur Bestimmung von K_m und v_{max} werden die Gruppenergebnisse pro Photometer im Michaelis-Menten Diagramm digital ausgewertet.

K_m : Die Michaelis-Menten-Konstante gibt die Affinität eines Enzyms gegenüber dem Substrat an. Der K_m -Wert beschreibt die Substratkonzentration, bei der die Hälfte der Enzyme als Enzym-Substrat-Komplex vorliegen. Die Umsetzungsgeschwindigkeit beträgt die Hälfte der maximalen Geschwindigkeit ($\frac{1}{2} v_{max}$).

v_{max} : Die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit des Enzyms.

Aufgabe:

- Öffnen Sie die Datei „Vorlage Enzymkinetik“
- Tragen Sie die Mittelwerte der Absorbanz in die markierte Spalte ein
- Bestimmen Sie den K_m -Wert mit Hilfe des Kurvenverlaufs
- Übernehmen Sie die Ausgleichskurve in Ihre graphische Darstellung (Seite 10)

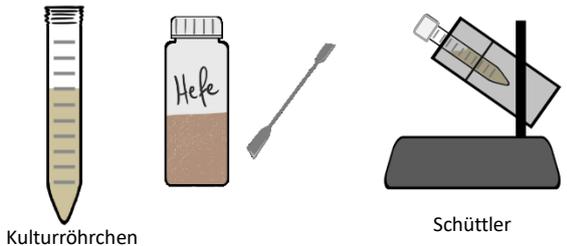
K_m -Wert der Alkoholdehydrogenase: _____

Station 6: Färbung und Mikroskopie der Hefezellen



Aufgabe: Färben Sie die Hefezellen mit Neutralrot und betrachten Sie diese unter dem Mikroskop.

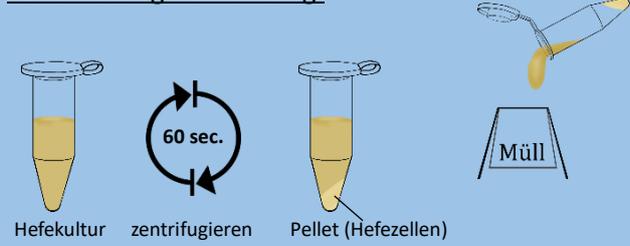
Hefekultur ansetzen:



- Pipettieren Sie 5 ml YPD-Medium in ein Kulturröhrchen
- Geben Sie eine Spatelspitze Trockenhefe in das Kulturröhrchen und lösen Sie diese
- Stellen Sie das Kulturröhrchen über die Mittagspause in den Schüttler

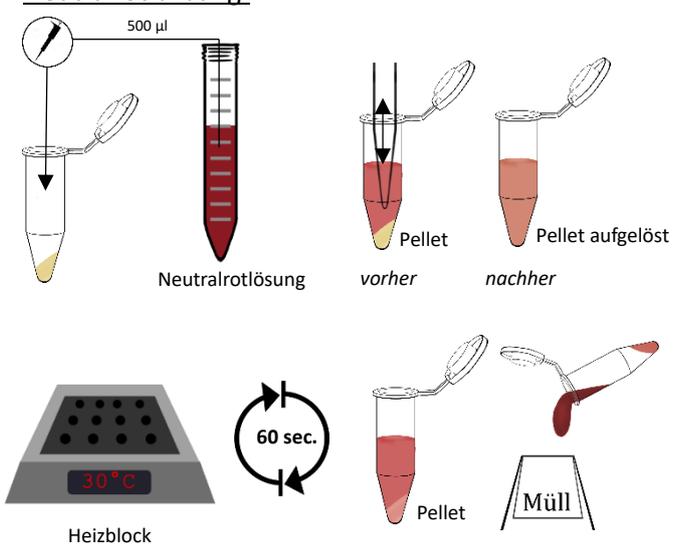
Mittagspause

Vorbereitung der Färbung:



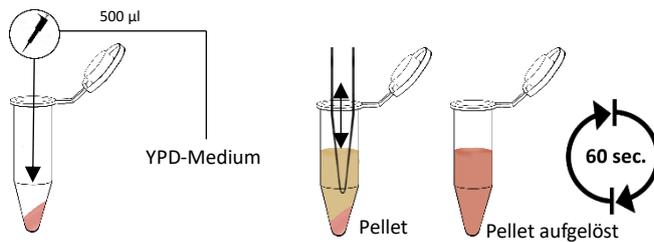
- Pipettieren Sie 1 ml der Hefekultur aus dem Kulturröhrchen in ein Eppi
- Zentrifugieren Sie die Hefezellen (60 sec)
- Schütten Sie den flüssigen Überstand in den Tischmüll

Neutralrotfärbung:



- **Handschuhe anziehen!**
- Pipettieren Sie 500 µl der Neutralrotlösung auf das Pellet
- Resuspendieren Sie das Pellet vollständig in der Lösung, indem Sie die Lösung mehrfach auf und ab pipettieren
- Stellen Sie das Eppi für 10 min bei 30 °C in den Heizblock
- Zentrifugieren Sie die Hefezellen (60 sec)
- Schütten Sie den flüssigen Überstand in den Tischmüll

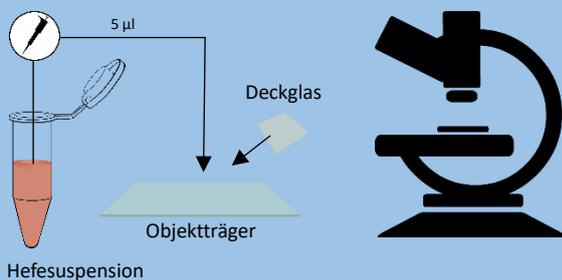
Waschen:



- Pipettieren Sie 500 µl des YPD-Mediums auf das Pellet
- Resuspendieren Sie das Pellet
- Zentrifugieren Sie die Hefezellen (60 sec)
- Schütten Sie den flüssigen Überstand in den Tischmüll
- Pipettieren Sie erneut 500 µl des YPD-Mediums auf das Pellet
- Resuspendieren Sie das Pellet



Mikroskopieren:



- Pipettieren Sie 5 µl der Hefesuspension auf einen Objektträger
- Legen Sie ein Deckgläschen auf das Präparat

Mikroskopieren Sie ihr Präparat:

- Beginnen Sie mit dem 10er Objektiv und stellen Sie das Präparat scharf
- Wechseln Sie zum 40er Objektiv (erneut scharf stellen)
- Geben Sie einen Tropfen Öl auf das Deckgläschen und wechseln Sie zum 100er Objektiv
- Stellen Sie das Präparat scharf und betrachten Sie die gefärbten Strukturen

Auswertung:



- Verbinden Sie die Kamera Ihres Mikroskops mit dem Tablet
- Starten Sie das Programm MotiConnect
- Fotografieren Sie die gefärbten Hefezellen
- Vermessen Sie eine Hefezelle

Durchmesser Hefezelle: _____

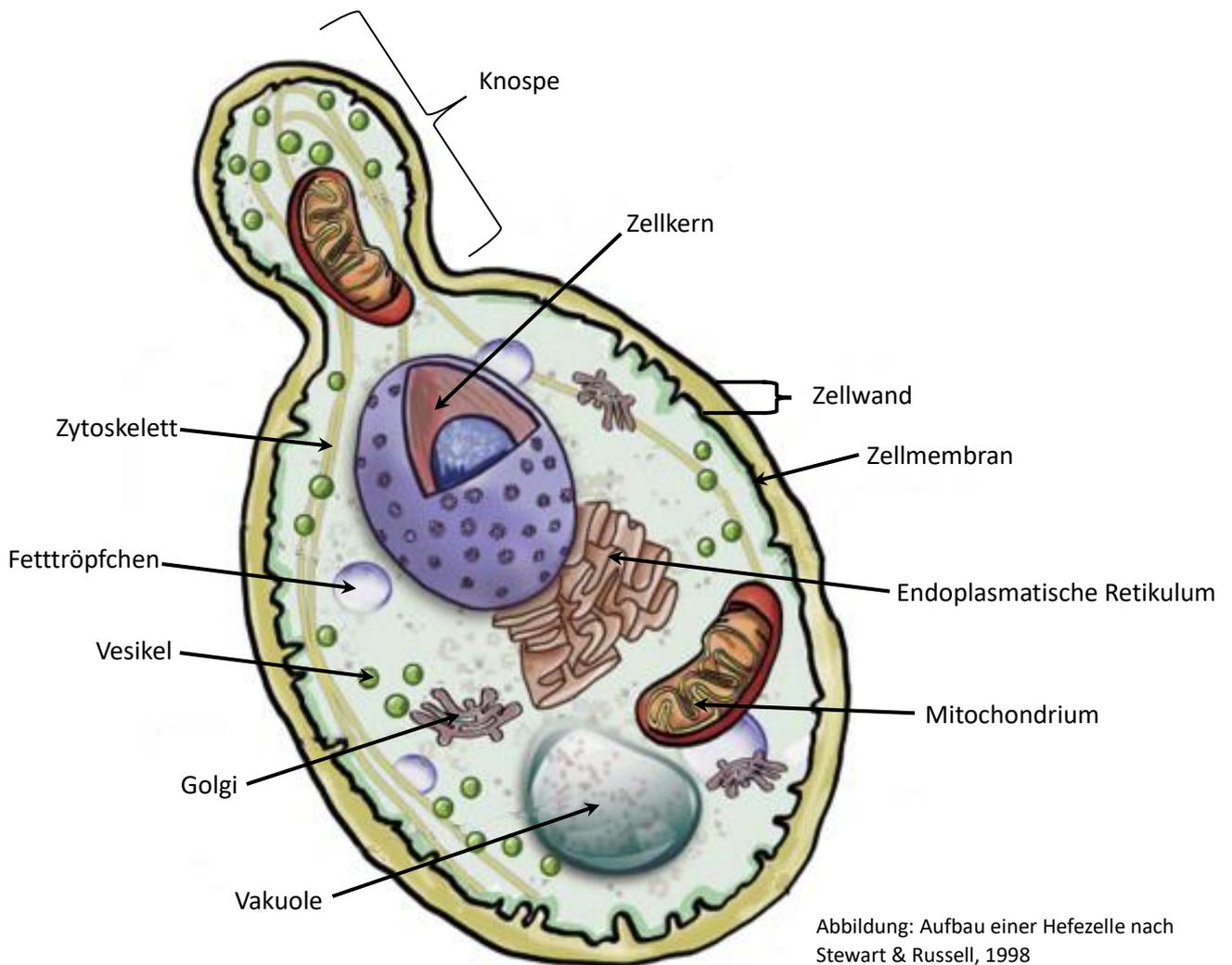


Der Vitalfarbstoff Neutralrot färbt spezifische Zellkompartimente.

Arbeitsauftrag:

Beantworten Sie die folgenden Leitfragen

- Welche Zellkompartimente wurden gefärbt? _____
- Sind alle Zellen gleichermaßen gefärbt? _____



Merck - TU Darmstadt

Lernlabor **Biologie**

Name:

Schule:

Gruppe:

Anmeldung unter:

lernlabor@bio.tu-darmstadt.de

Homepage:

<https://www.biolernlabtudarmstadt.de>