

Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen

Projektarbeit im Rahmen der Ausbildung
zum Biotechnologischen Assistenten

Von
Björn Eberle, Christian Schmid und Niko Zankl

Inhaltsverzeichnis

Titel.....	1
Ziel.....	3
Materialien.....	4
Methoden.....	5
Vorgehen und Ergebnisse.....	7
Auswertung und Berechnung.....	15
Diskussion.....	16
Zusammenfassung.....	17
Begriffserläuterungen.....	17
Quellen.....	18
Anhang.....	19

Ziel

Mit dieser Projektarbeit soll untersucht werden, wie sich Zellen bei verschiedenen Glucosekonzentrationen im Medium in Bezug auf ihre Hexokinaseproduktion verhalten. Versuchen die Zellen eine höhere Konzentration zu kompensieren, indem sie mehr Hexokinase synthetisieren, oder hat die Glucosekonzentration keinen Einfluss auf die Hexokinasemenge? Außerdem wird untersucht, ob die gewählte Methode zur Hexokinasereinigung und -quantifizierung geeignet ist.

Der Literatur und den Informationen aus dem Internet konnten keine in diese Richtung gehende Ergebnisse entnommen werden, jedoch ist laut Herrn Prof. Dr. Wiesinger kein Einfluss der Glucosekonzentration auf die Hexokinaseproduktion zu erwarten.

Materialien

Sicherheitswerkbank HERAsafe von Heraeus
Sterile Pipetten (1 mL und 10 mL)
Zellinkubator HERAcell 240 von Heraeus
Phasenkontrastmikroskop Leica DMIL
Kühlschrank
Gefrierschrank -18°C
Gefrierschrank -81°C HERAfreeze von Heraeus
Analysenwaage
Spatel
Zentrifuge Megafuge 1.0 R von Heraeus
Zentrifugenröhrchen 50 mL
Zentrifugenröhrchen 14 mL
Vortexer
Zentrifuge für Eppendorfcups VWR Galaxy 7D
Eppendorfcups
Kryoröhrchen



Kulturflaschen große Kulturflaschen
6-Loch-Platte
Photometer (Filter für 366 nm und 578 nm) Labtronic S 100
UV - Küvette
Halbmikro - Küvette
Eppendorf Pipetten 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL
Spritze 25 mL
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)
Parafilm
Dialyseschlauch
Erlenmeyerkolben 250 mL
Becherglas 250 mL
Becherglas 1 L
Messzylinder 100 mL
Messzylinder 250 mL

Chemikalien

Medium: DMEM 10% FCS
Trypsin
PBS
10% Phosphatpuffer
Sephrose Gel CL 6B
D-Glucose
Glucose-6-Phosphat
Testmischung für gekoppelten optischen Test
Hexokinase
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Methoden

Nachweis von Hexokinase

Durch einen gekoppelten optischen Test:

Hexokinase phosphoryliert Glucose mit ATP zu Glucose-6-Phosphat. Liegt dazu noch das Enzym Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (oxidiert Glucose-6-Phosphat mit Hilfe von NADP^+ zu 6-Phosphogluconolacton und $\text{NADPH} + \text{H}^+$) im Überschuss, sowie NADP^+ vor, so kann man bei einer Wellenlänge von 366 nm am Photometer einen Extinktionsanstieg beobachten, da NADPH bei 340 nm sein Absorptionsmaximum besitzt. Es wird bei 366 nm gemessen, weil für das Photometer nur ein Filter für 366 nm zur Verfügung steht.

Affinitätschromatographie mit Blue Sepharose Gel CL-6B

Nach J. E. Wilson, Biochemistry Dept., Michigan State University, East Lansing 48823:

„The mitochondrial hexokinase from rat brain, selectively released from mitochondria by the action of glucose 6-phosphate, can be purified to greater than 90% homogeneity by a single affinity chromatography step on Affi-Gel Blue; the Cibacron Blue F3GA ligand bound to this matrix serves as an analog of ATP, the normal substrate for the enzyme, and selective elution is accomplished using glucose 6-phosphate which is a competitive ligand vs. ATP. With this and other modifications to the previously described procedure highly purified enzyme is readily obtained in good yield and with retention of the ability to rebind to mitochondria.“

Blue Sepharose Gel CL-6B besitzt eine Affinität zu allen Enzymen, die ein Nukleotid als Substrat haben. Die Enzyme binden an die Chromophoren, die spezifischen Bindungsstellen des Gels.

Bei diesem Projekt wird die zu untersuchende Lösung auf ein Blue Sepharose Gel im Eppendorfcup gegeben und durch Vortexen des Eppendorfcups gleichmäßig im Gel verteilt. Die Hexokinase bindet an die Chromophoren. Durch anschließende Zentrifugation des Eppendorfcups setzt sich das Gel mit den nukleotidbindenden Enzymen unten ab und der Überstand ist die Untersuchungslösung ohne diese Enzyme.

Die Hexokinase kann durch Zugabe einer Glucose-6-Phosphat-Lösung in das Eppendorfcup und anschließendem Vortexen spezifisch aus dem Gel eluiert werden. Nach erneuter Zentrifugation befindet sich die Hexokinase im Überstand. Um die Hexokinase nachweisen zu können, muss Glucose-6-Phosphat durch Dialyse entfernt werden, da es den gekoppelten optischen Test stört.

Inkubation der Zellen

Drei Kulturen mit je einem anderen Medium, das eine Glucosekonzentration von 0,5 mM, 10 mM oder 25mM hat, werden unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Aufschlussverfahren

Die Zellen werden durch Behandlung mit hypotonem Puffer (10 mM Phosphatpuffer) sowie Einfrieren und anschließendes Auftauen aufgeschlossen. Die Hexokinase ist ein cytosolisches Enzym und befindet sich nach dem Aufschließen im Überstand.

Nachweis der Proteinmenge

Proteine werden mit der Bradfordmethode quantifiziert. Durch einen Vergleich der Gesamtproteinmenge der jeweils gleichen Zellzahl aus den verschiedenen Kulturen mit der Menge der eluierten Hexokinase jeder Kultur kann auf den Anteil der Hexokinase an den cytosolischen Proteinen der unterschiedlich inkubierten Zellen geschlossen werden. Durch Vergleich der Hexokinasmengen der unterschiedlich inkubierten Kulturen kann auf eine unterschiedliche absolute Produktion von Hexokinase je Kultur geschlossen werden.

Dialyse

Dialyse von kleinen Volumina:

Mit einem heißen Spatel wird ein Loch in den Deckel eines Eppendorfcups geschmolzen, die zu dialysierende Substanz wird in das Eppendorfcup gegeben und zwischen das Eppendorfcup und den Deckel mit Loch ein Stück einlagigen Dialyseschlauch = Dialysemembran gebracht und der Deckel geschlossen.

Das Eppendorfcup wird in einen Styroporschwimmer gesteckt und die Seite mit dem Loch im Deckel wird in der Substanz, gegen die dialysiert wird, untergetaucht. Es ist wichtig, dass sich im spitzigen Teil des Eppendorfcups keine Substanz befindet, da sie nicht dialysiert wird, wenn sie keine Verbindung zur Substanz am Deckel hat.

Zellkultur

Die genauen Verfahren der Zellkultur sind den Protokollen im Anhang zu entnehmen.

Zellen zählen

Die Zellzahl, die in vier Quadraten einer Neubauer-Zählkammer ermittelt wird, wird durch vier geteilt, um die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat zu erhalten. Multipliziert man diesen Wert mit 10^4 , so erhält man die Zellzahl pro mL und kann somit auf die Gesamtzellzahl schließen.

Vorgehen und Ergebnisse

(genaues Vorgehen siehe Protokolle im Anhang)

07.12.2006 - Splitten einer Kultur in zwei große Kulturflaschen

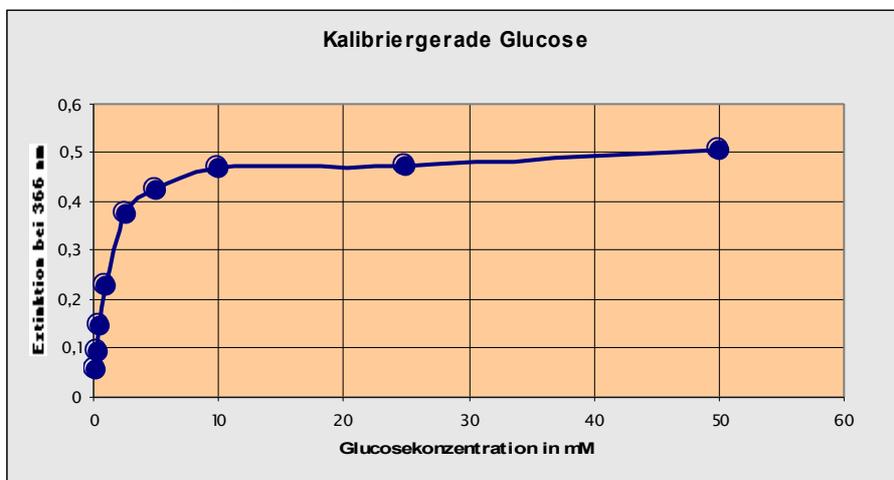
12.12.2006 - Mediumwechsel bei den großen Kulturflaschen und Mediumherstellung

14.12.2006 - Zellernte und Lagerung der geernteten Zellen

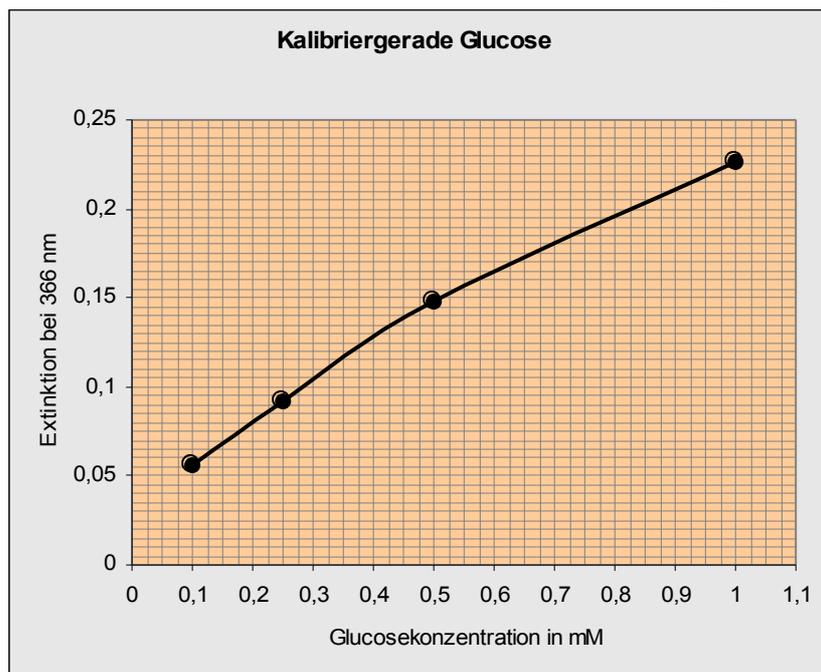
16.01.2007 - Bestimmung der Glucosekonzentration in FCS

Glucosekonzentration in mM	50	25	10	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1
Extinktion bei 366 nm	0,505	0,475	0,47	0,425	0,377	0,227	0,148	0,092	0,056

Kalibriergerade aus diesem Ergebnis:



Da diese Kalibriergerade eigentlich eine Kurve und deshalb nicht sehr hilfreich ist, wird eine weitere erstellt, bei der nur der lineare Bereich einbezogen wird:



Aus dieser Kalibriergeraden kann man für FCS (1:10 verdünnt, gemessene Extinktion: 0,156) eine Glucosekonzentration von ungefähr 0,525 mM ablesen. Unverdünntes FCS besitzt eine Glucosekonzentration von 5.25 mM.

18.01.2007 - Herstellung von Medien mit 0,5 mM bzw. 10 mM Glucose

Anmerkung:

Durch die Zugabe von 25 mL FCS zu 250 mL Medium (10% FCS) sind die Molaritäten an Glucose in den beiden Medien auf 0,45 mM bzw. 9,55 mM verdünnt worden. Der Einfachheit halber werden die Medien aber unter der Bezeichnung 0,5 mM bzw. 10 mM Glucose weitergeführt.

23.01.2007 - Splitten einer Kultur in drei große Kulturflaschen

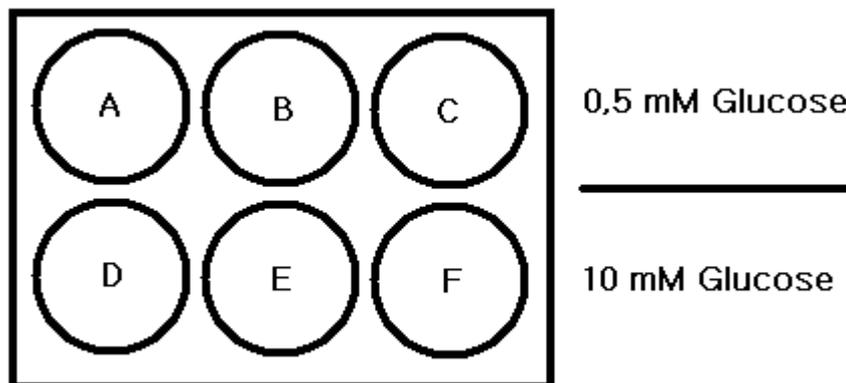
01.02.2007 - Qualitativer Nachweis von Hexokinase im Zellpellet vom 14.12.2006

Innerhalb von 5 min stieg die Extinktion bei 366 nm von 0,00 auf 1,2.
Es wurde im Überstand des lysierten und zentrifugierten Zellpellets Hexokinase qualitativ nachgewiesen.

06.02.2007 - Medienwechsel bei den großen Kulturflaschen (unterschiedliche Medien)

Am 08.02.2007 wurde festgestellt, dass die Kulturflaschen mit 0,5 mM und 10 mM Glucose kontaminiert sind. Deshalb wurde eine 6-Loch-Platte mit 2 mL Stichproben aus den betreffenden Medien befüllt und in den Inkubator gestellt.

Befüllungsübersicht:



Am 12.02.2007 wurde festgestellt, dass alle Medien kontaminiert sind.

12.02.2007 – Sterilfiltrieren der kontaminierten Medien

12.02.2007 - Splitten der übrigen Kultur in drei große Kulturflaschen

15.02.2007 - Mediumwechsel bei den großen Kulturflaschen (unterschiedliche Medien)

22.02.2007 - Zellernte, Zählen und Lagerung der geernteten Zellen

Die Zellsuspension mit 25 mM Glucose enthielt 620 Zellen in 4 Quadraten einer Neubauer-Zählkammer; Gesamtvolumen: 10 mL.

Die Zellsuspension mit 10 mM Glucose enthielt 320 Zellen und Klumpen (ca. 100-200 Zellen) in 4 Quadraten einer Neubauer-Zählkammer; Gesamtvolumen: 10 mL.

Die Zellkultur mit 0,5 mM Glucose war von der Kulturflasche abgelöst und somit nicht zu verwenden.

27.02.2007 - Untersuchung, ob die Lagerung des Überstands im Kühlschrank geeignet ist

Der Überstand vom 14.12.2006 hatte einen üblen Geruch, und es konnte keine Aktivität der Hexokinase nachgewiesen werden. Die Lagerung des Überstandes im Kühlschrank ist ungeeignet. Einfrieren der Pellets scheint sinnvoller zu sein.

27.02.2007 - Herauslösen der Hexokinase aus den Zellpellets

27.02.2007 - Bestimmung des Gesamtproteingehalts in den Überständen

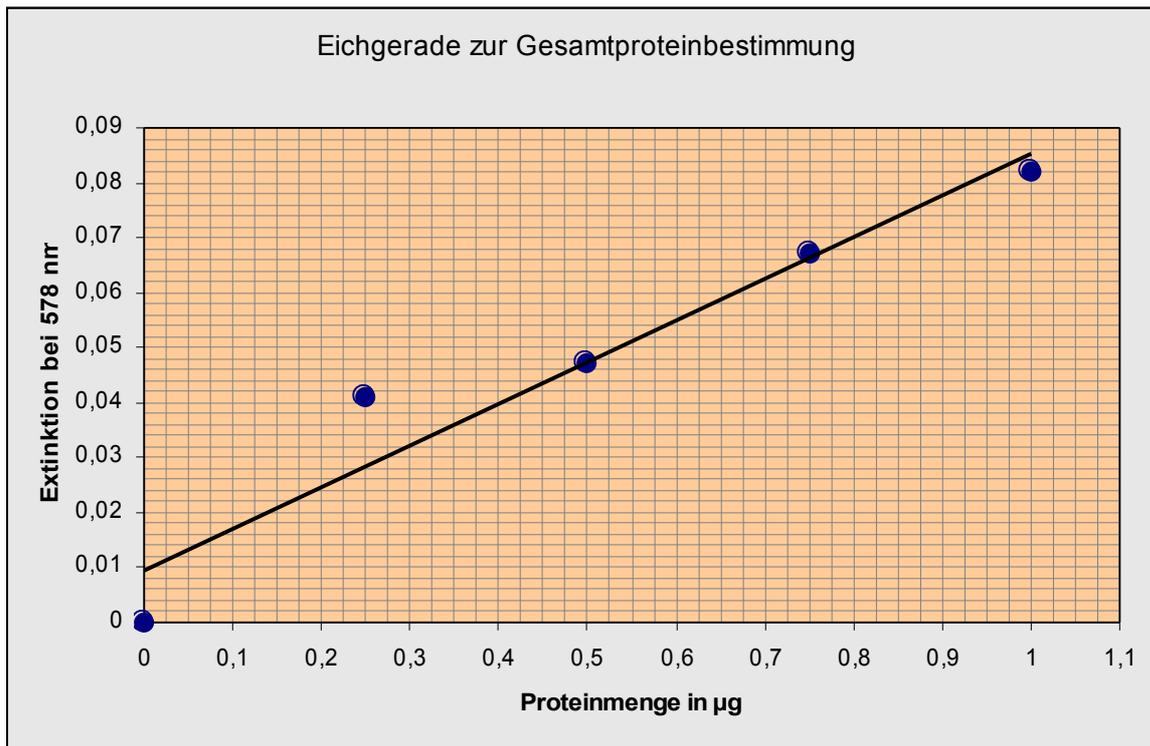
Ansatzschema:

Standard	Aqua demin.	RSA - Lösung 10 µg/mL		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
Leerwert	100 µL	0,0 µL	0,00 µg	900 µL	0
S1	97,5 µL	2,5 µL	0,25 µg	900 µL	0,041
S2	95,0 µL	5,0 µL	0,50 µg	900 µL	0,047
S3	92,5 µL	7,5 µL	0,75 µg	900 µL	0,067
S4	90,0 µL	10 µL	1,00 µg	900 µL	0,082
Probe	Aqua demin.	Vorverdünnte Probe		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
P25	95 µL	5 µL		900 µL	0,064
P10	95 µL	5 µL		900 µL	0,042

P25 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 25 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde,

P10 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 10 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde.

Graphische Auswertung:



P25 lieferte eine Extinktion von 0,064 und hat daher eine Proteinmenge von 0,713 μg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 0,713 $\mu\text{g/mL}$.
P10 lieferte eine Extinktion von 0,042 und hat daher eine Proteinmenge von 0,428 μg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 0,428 $\mu\text{g/mL}$.

Insgesamt wurden beide Proben $1:10^4$ verdünnt. Daraus ergeben sich folgende Proteinkonzentrationen in den Überständen:

Der Überstand der Zellen mit 25 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 7,13 mg/mL

Der Überstand der Zellen mit 10 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 4,28 mg/mL

Ergebnis:

Aus dem Pellet der Zellen, die einem Medium mit 25 mM Glucose ausgesetzt waren, konnten mit 2 mL Lysepuffer 14,26 mg Protein gewonnen werden.

Aus dem Pellet der Zellen, die einem Medium mit 10 mM Glucose ausgesetzt waren, konnten mit 2 mL Lysepuffer 8,650 mg Protein gewonnen werden.

27.02.2007 - Ansäen zweier Kulturflaschen mit aufgetauten Zellen

Eine der Kulturflaschen war am 02.03.2007 kontaminiert.

02.03.2007 - Ansäen zweier Kulturflaschen mit aufgetauten Zellen

05.03.2007 - Medienwechsel bei drei Kulturen

08.03.2007 - Medienwechsel bei drei Kulturen, zweimal 25 mM, einmal 0,5 mM Glucose

12.03.2007 - Begutachtung der Kulturen mit 25 mM und 0,5 mM Glucose

25 mM Glucose: Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
0,5 mM Glucose: Medium ist orange und klar, Zellen sind klein, rund und teilweise abgelöst.

12.03.2007 - Untersuchung, ob Hexokinase nach Einfrieren im Überstand stabil bleibt

Innerhalb von 10 min stieg die Extinktion bei 366 nm von 0,00 auf 0,294.
Es wurde im aufgetauten Überstand Hexokinase nachgewiesen.

12.03.2007 - Herstellung von Blue Sepharose Gel CL-6B

13.03.2007 - Bindung der Hexokinase in Blue Sepharose Gel CL-6B

In beiden Ansätzen konnte eine Extinktionsanstieg von durchschnittlich 4 mOD pro 15 Sekunden gemessen werden. Das bedeutet, dass im Überstand noch immer Hexokinase vorhanden ist.

13.03.2007 - Bindung der Hexokinase in Blue Sepharose Gel CL-6B

Es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden, Die Hexokinase wurde im Gel gebunden.

13.03.2007 - Herstellung von Blue Sepharose Gel CL-6B

14.03.2007 - Herstellung einer 50 mM Glucose-6-Phosphat-Lösung

15.03.2007 - Elution der Hexokinase aus Blue Sepharose Gel CL-6B und Dialyse

16.03.2007 - Untersuchung der dialysierten Proteinlösung auf Hexokinaseaktivität

Es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden, es war keine Hexokinase im Dialyseansatz vorhanden.

20.03.2007 – Bestimmung des Hexokinasegehaltes in den Überständen

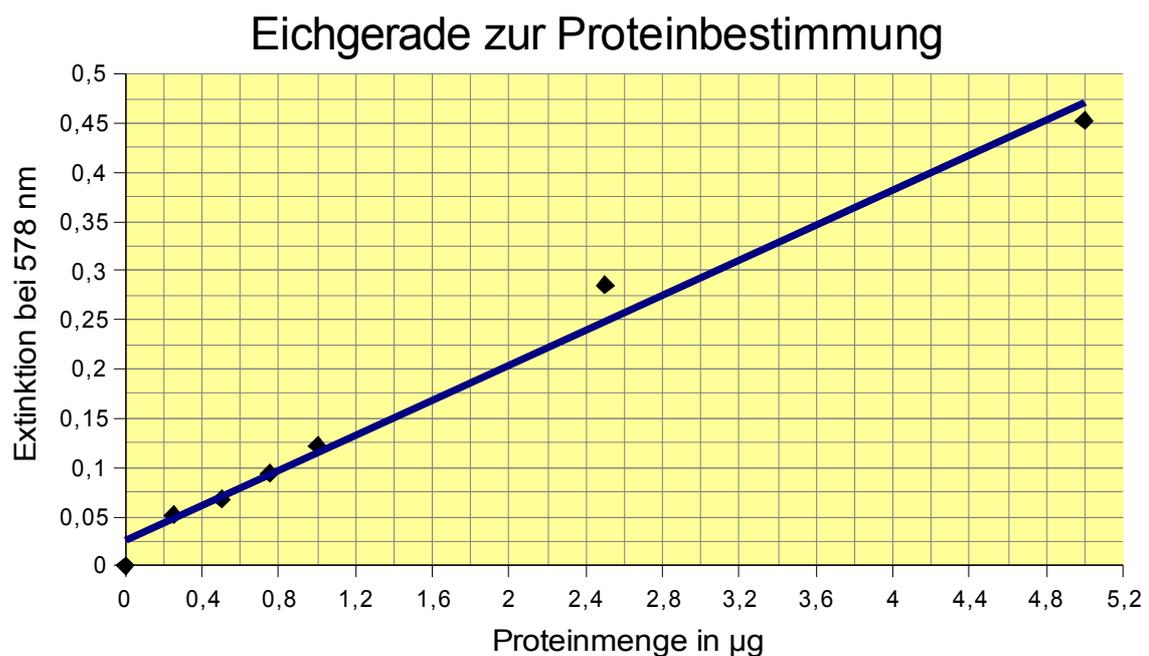
Ansatzschema:

Standard	Aqua demin.	RSA-Lösung 0,1 mg/mL		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
Leerwert	100 µL	0,0 µL	0,00 µg	900 µL	0
S1	97,5 µL	2,5 µL	0,25 µg	900 µL	0,052
S2	95,0 µL	5,0 µL	0,50 µg	900 µL	0,068
S3	92,5 µL	7,5 µL	0,75 µg	900 µL	0,094
S4	90,0 µL	10 µL	1,00 µg	900 µL	0,122
Standard	Aqua demin.	RSA - Lösung 1 mg/mL		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
S5	97,5 µL	2,5 µL	2,50 µg	900 µL	0,285
S6	95,0 µL	5,0 µL	5,00 µg	900 µL	0,452
Probe	Aqua demin.	Überstand		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
P10Ü1	95 µL	5 µL		900 µL	0,249
P10Ü2	95 µL	5 µL		900 µL	0,151
P25Ü1	95 µL	5 µL		900 µL	0,290
P25Ü2	95 µL	5 µL		900 µL	0,149

P25 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 25 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde,

P10 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 10 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde.

Graphische Auswertung:



P10Ü1 lieferte eine Extinktion von 0,249 und hat daher eine Proteinmenge von 2,5 µg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 2,5 µg/mL.
P10Ü2 lieferte eine Extinktion von 0,151 und hat daher eine Proteinmenge von 1,4 µg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 1,4 µg/mL.
P25Ü1 lieferte eine Extinktion von 0,290 und hat daher eine Proteinmenge von 2,95 µg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 2,95 µg/mL.
P25Ü2 lieferte eine Extinktion von 0,149 und hat daher eine Proteinmenge von 1,4 µg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 1,4 µg/mL.

Insgesamt wurden alle Proben 1:600 verdünnt. Daraus ergeben sich folgende Proteinkonzentrationen in den Überständen:

Ü1 der Zellen mit 10 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 1,50 mg/mL.
Ü2 der Zellen mit 10 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 0,84 mg/mL.
Ü1 der Zellen mit 25 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 1,77 mg/mL.
Ü2 der Zellen mit 25 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 0,84 mg/mL.

Ü1 steht für die Proteine, die nicht im Gel binden.
Ü2 steht für die eluierte Hexokinase.

Ergebnis:

3,00 mg der Proteine aus den Zellen mit 10 mM Glucose binden sich nicht im Gel.
3,54 mg der Proteine aus den Zellen mit 25 mM Glucose binden sich nicht im Gel.
Beide Zellkulturen haben 1,68 mg Hexokinase produziert.

22.03.2007 - Bestimmung des Gesamtproteingehalts in den Überständen

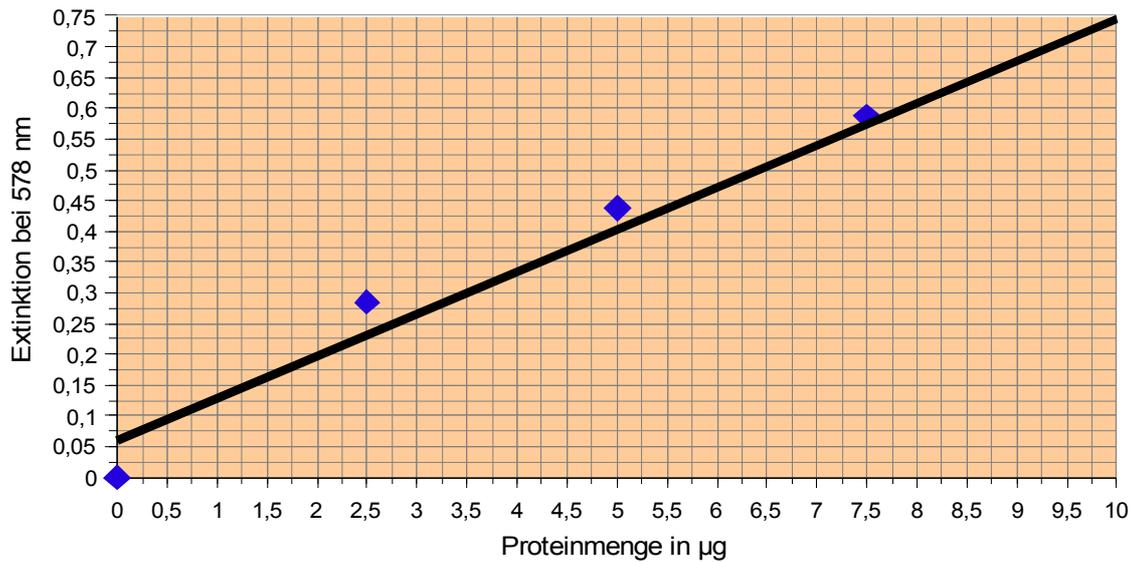
Ansatzschema:

Standard	Aqua demin.	RSA - Lösung 1		Bradfordreage	Extinktion bei 578
		mg/mL		nz	nm
Leerwert	100 µL	0,0 µL	0,00 µg	900 µL	0
S1	97,5 µL	2,5 µL	2,5 µg	900 µL	0,285
S2	95,0 µL	5,0 µL	5,0 µg	900 µL	0,437
S3	92,5 µL	7,5 µL	7,5 µg	900 µL	0,587
S4	90,0 µL	10 µL	10 µg	900 µL	0,706
Probe	Aqua demin.	Vorverdünnte Probe		Bradfordreage	Extinktion bei 578
				nz	nm
P25	95 µL	5 µL		900 µL	0,297
P10	95 µL	5 µL		900 µL	0,276

P25 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 25 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde,
P10 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 10 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde.

Graphische Auswertung:

Eichgerade zur Gesamtproteinbestimmung



P25 lieferte eine Extinktion von 0,297 und hat daher eine Proteinmenge von 3,5 μg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 3,5 $\mu\text{g/mL}$.

P10 lieferte eine Extinktion von 0,276 und hat daher eine Proteinmenge von 3,13 μg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 3,13 $\mu\text{g/mL}$.

Insgesamt wurden beide Proben 1:2000 verdünnt. Daraus ergeben sich folgende Proteinkonzentrationen in den Überständen:

Der Überstand der Zellen mit 25 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 7,00 mg/mL

Der Überstand der Zellen mit 10 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 6,26 mg/mL

Ergebnis:

Aus dem Pellet der Zellen, die einem Medium mit 25 mM Glucose ausgesetzt waren, konnten mit 2 mL Lysepuffer 14,00 mg Protein gewonnen werden.

Aus dem Pellet der Zellen, die einem Medium mit 10 mM Glucose ausgesetzt waren, konnten mit 2 mL Lysepuffer 12,52 mg Protein gewonnen werden.

Auswertung und Berechnung

Zusammenfassung der Ergebnisse

Glucosekonzentration von FCS: 5,25 mM (10% FCS: 0,525 mM)

Zellausbeute aus der Kultur mit 25 mM Glucose: 62 Mio.

Zellausbeute aus der Kultur mit 10 mM Glucose: 47 Mio.

Aus den Zellen der Kultur mit 25 mM Glucose konnten 14,13 mg Protein gewonnen werden.
(Mittelwert)

Aus den Zellen der Kultur mit 25 mM Glucose haben sich 3,54 mg Protein nicht ins Gel gebunden.

Die Zellen der Kultur mit 25 mM Glucose produzierten 1,86 mg Hexokinase.

Aus den Zellen der Kultur mit 10 mM Glucose konnten 10,59 mg Protein gewonnen werden.
(Mittelwert)

Aus den Zellen der Kultur mit 10 mM Glucose haben sich 3,00 mg Protein nicht ins Gel gebunden.

Die Zellen der Kultur mit 10 mM Glucose produzierten 1,86 mg Hexokinase.

Berechnungen

Alle Angaben werden auf 50 Mio. Zellen bezogen:

50 Mio. Zellen aus der Kultur mit 25 mM Glucose

- liefern 11,4 mg Protein
- haben 2,85 mg Proteine, die nicht ins Gel binden, und 8,55 mg Protein, die ins Gel binden
- haben 1,5 mg Hexokinase produziert
- 75% der cytosolischen Proteine sind nukleotidspezifische Proteine
- 13,2% der cytosolischen Proteine sind Hexokinasen

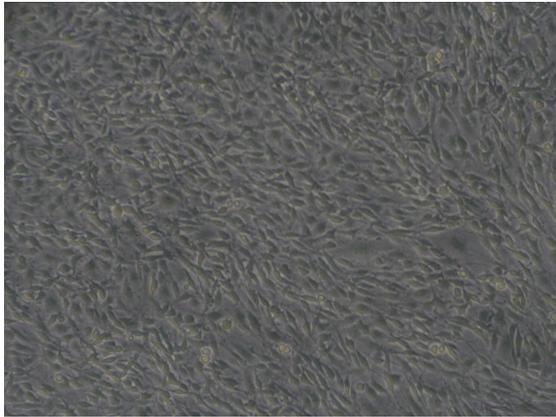
50 Mio. Zellen aus der Kultur mit 10 mM Glucose

- liefern 11,26 mg Protein
- haben 3,20 mg Proteine, die nicht ins Gel binden, und 8,06 mg Protein, die ins Gel binden
- haben 1,98 mg Hexokinase produziert
- 71,6% der cytosolischen Proteine sind nukleotidspezifische Proteine
- 17,6% der cytosolischen Proteine sind Hexokinasen

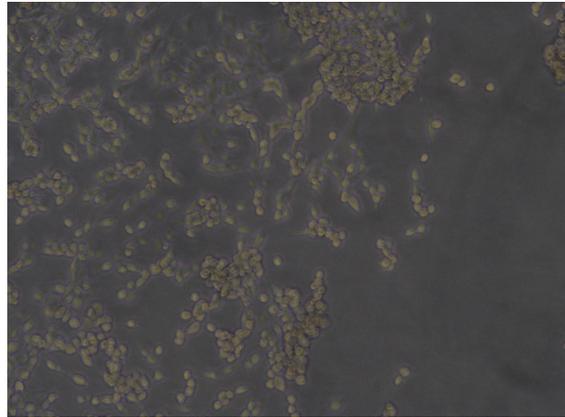
Die Zellen aus der Kultur mit 10 mM Glucose produzierten 32% mehr Hexokinase als die Zellen aus der Kultur mit 25 mM Glucose.

Diskussion

Die Berechnungen zeigen, dass der Glucosegehalt eines Mediums die Hexokinaseproduktion der Zellen so beeinflusst, dass die Zellen bei niedriger Glucosekonzentration mehr Hexokinase produzieren. Ist die Glucosekonzentration aber zu gering (z.B. 0,5 mM), so lösen sich die Zellen ab, wie auf den Bildern vom 12.03.2007 zu sehen ist:



angewachsene, gesunde Zellen



abgelöste Zellen, die zu wenig Glucose haben

Diese Ergebnisse sind jedoch nicht zweifelsfrei richtig, da die angewandte Methode zur Reinigung der Hexokinase sehr ungenau ist, weil das Gel im Eppendorfcup trotz Vortexen und Zentrifugieren nicht nur die nukleotidspezifischen Proteine bindet, sondern auch viele andere, die aufgrund der Viskosität des Gels dort eingeschlossen sind und auch durch die Zentrifugation nicht austreten können. Ein besseres Ergebnis wäre erzielbar gewesen, wenn man das Affinitätsmaterial in eine Säule gepackt und die cytosolischen Proteine hindurchfließen lassen hätte.

Es wurde auch nicht nachgewiesen, dass die nach der Elution mit Glucose-6-Phosphat mit Bradford gemessenen Proteine tatsächlich Hexokinase-Enzyme sind, da die Ergebnisse des Dialyseversuchs nicht mit den theoretisch zu erwartenden Ergebnissen übereinstimmen, was vermutlich daran lag, dass die Hexokinase während der Dialyse, die einige Zeit in Anspruch nahm, denaturierte. Der Versuch wurde aus Zeitgründen nicht wiederholt.

Zusammenfassung

Die Synthese von Hexokinase durch C6-Zellen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration wurde mittels dieser Projektarbeit nachgewiesen. Nach den Ergebnissen reagieren die Zellen auf einen Überschuss an Glucose mit einer niedrigen Hexokinaseproduktion. Jedoch hat sich die Methode, die zur Aufreinigung der Hexokinase angewandt wurde, als ungeeignet erwiesen. Sie wirkt sich negativ auf das Ergebnis aus und dieses besitzt somit keine Aussagekraft.

The synthesis of hexokinase by C6-cells dependent on the concentration of glucose was proved with this project. According to the results, the cells react to a surplus of glucose by decreasing the production of hexokinase. However, the method used to purify the hexokinase turned out to be inappropriate. It affects the results in a negative way and so takes away their significance.

Begriffserläuterungen

DMEM: Dulbeccos Modified Eagle Medium; Definiertes Kulturmedium für Zellen

FCS: Fetal Calf Serum; Serum aus fötalen Kälbern

Trypsin: Verdauungsenzym, Peptidase; Dient zum Ablösen von Zellen in der Kulturflasche

PBS: Phosphate Buffered Saline; Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung

C6-Zellen: Gliazelllinie aus Rattenhirn

Quellen

J. E. Wilson, Biochemistry Dept., Michigan State University, East Lansing 48823:
Rapid purification of mitochondrial hexokinase from rat brain by a single affinity
chromatography step on Affi-Gel blue.
auf <http://www.pubmed.gov>

Alle anderen Methoden wurden aus den Unterrichtsmaterialien entnommen.

Eventuelle Abweichungen sind in den Protokollen im Anhang beschrieben.

Anhang:
Protokolle

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Splitten einer Kultur in zwei große Kulturflaschen

07.12.2006

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10 mL)
- Zellinkubator
- Zentrifuge
- Eine Passage C6-Zellen in Kulturflasche
- Medium: DMEM 10% FCS
- Trypsin
- PBS
- Zentrifugenröhrchen
- Zwei große Kulturflaschen

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkultur C6 P60 vom 29.11.2006: Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
- Medium der Kultur abgesaugt
- Zellen in 10 mL PBS gewaschen, nach ca. 1 min das PBS abgesaugt
- Zellen mit ca. 6 mL Trypsin abgelöst, durch leichte mechanische Schläge unterstützt
- In ein Zentrifugenröhrchen 20 mL Medium vorlegen, 6 mL Zellsuspension hinzugefügt
- 10 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute und 21°C zentrifugiert
- Überstand abgesaugt
- Pellet mit 10 mL PBS waschen um letzte Trypsinrückstände auszuwaschen, trituriert
- 6 min bei 15000 Umdrehungen und 21°C zentrifugiert
- Überstand abgesaugt
- 10 mL Medium auf Zellen geben, trituriert
- In zwei große Kulturflaschen je 45 mL Medium vorgelegt
- In jede große Kulturflasche 5 mL Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen gegeben
- Die beiden großen Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Mediumwechsel bei den großen Kulturflaschen und Mediumherstellung

12.12.2006

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10 mL)
- Zellinkubator
- DMEM
- FCS
- Medium: DMEM 10% FCS
- PBS
- Die großen Kulturflaschen C6 P61 vom 07.12.2006

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkultur C6 P61 vom 07.12.2006: Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
- Medium hergestellt: 500 mL DMEM mit 50 mL FCS versetzt
- Das Medium einer großen Kulturflasche abgesaugt
- Die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen, nach ca. 1 min das PBS abgesaugt
- 50 mL frisches Medium auf die Zellen gegeben
- Schritte 3 - 5 für die zweite große Kulturflasche wiederholt
- Beide große Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Zellernte und Lagerung der geernteten Zellen

14.12.2006

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10 mL)
- Gefrierschrank -18 °C
- Zentrifuge
- PBS
- Trypsin
- Zentrifugenröhrchen
- Die großen Kulturflaschen C6 P61 vom 07.12.2006

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkultur C6 P61 vom 07.12.2006: Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
- Das Medium einer großen Kulturflasche abgesaugt
- Zellen in 20 mL PBS gewaschen, nach ca. 1 min das PBS abgesaugt
- Zellen mit ca. 10 mL Trypsin abgelöst, durch leichte mechanische Schläge unterstützt
- 10 mL Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen gegeben
- Schritte 2 - 5 für die zweite große Kulturflasche wiederholt
- Das Zentrifugenröhrchen mit 20 mL Zellsuspension in Trypsin 10 min bei 15000 Umdrehungen und 21°C zentrifugiert
- Der Überstand aus dem Zentrifugenröhrchen abgesaugt
- Das Pellet im Zentrifugenröhrchen eingefroren

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Bestimmung der Glucosekonzentration in FCS

16.01.2007

Material:

- Eppendorfcups
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μL , 100 - 1000 μL
- UV - Küvette
- Photometer
- Becherglas

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Glucose * H_2O (M = 198 g/mol)
- Testmischung (40 mM TEA, 8 mM MgCl_2 , 0.9 mM NADP^+ , 0.65 mM ATP)
- Hexokinase (0.04 mg/mL)
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) (0.002 mg/mL)

Durchführung:

Es wurde(n):

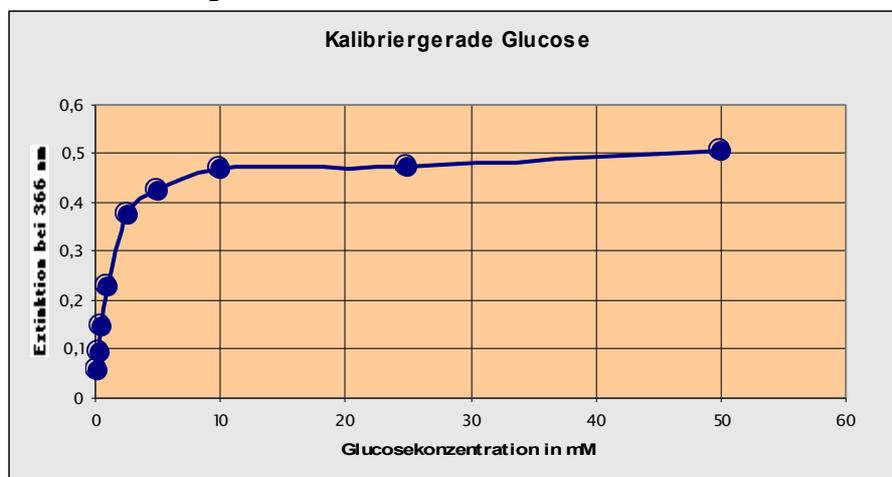
- Eine 50 mM Glucosestammlösung hergestellt:
98.9 mg Glucose * H_2O in 9.98 mL Wasser gelöst
(99 mg Glucose * H_2O in 10 mL Wasser = 50 mM)
- Eine Verdünnungsreihe mit der Stammlösung in Eppendorfcups hergestellt
- FCS in einem Eppendorfcup 1:10 verdünnt
- In 10 Eppendorfcups je 750 μL Testmischung, 100 μL Hexokinase, 100 μL G6PDH pipettiert
- In 9 Ansätze eine Glucoseverdünnung gegeben und in den 10. das verdünnte FCS
- Nach 25 min bei jedem Ansatz die Extinktion bei 366 nm gemessen

Auswertung:

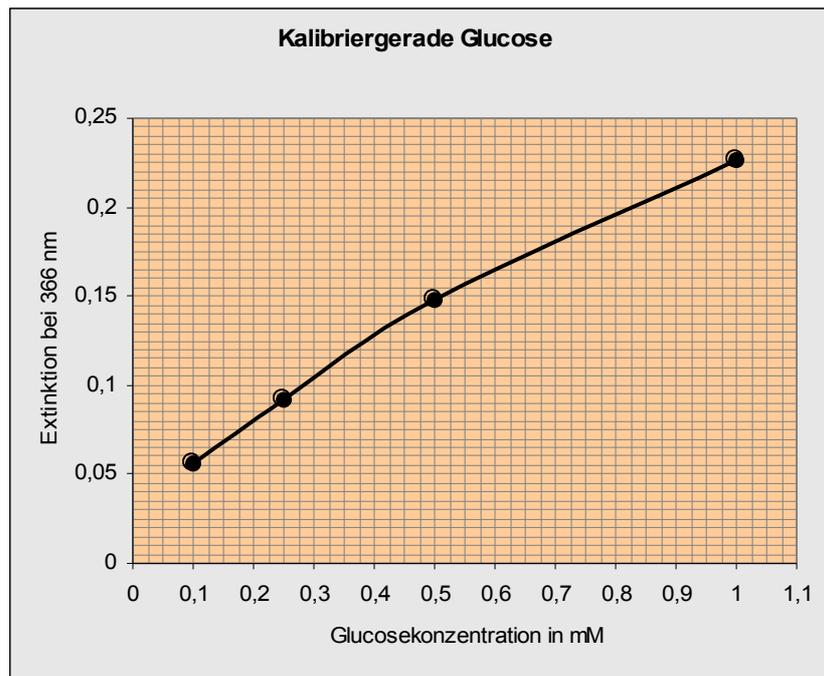
Ergebnis:

Glucosekonzentration in mM	50	25	10	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1
Extinktion bei 366 nm	0,505	0,475	0,47	0,425	0,377	0,227	0,148	0,092	0,056

Kalibriergerade aus diesem Ergebnis:



Da diese Kalibriergerade nicht sehr hilfreich ist, wird eine weitere erstellt, bei der nur der lineare Bereich einbezogen wird:



Aus dieser Kalibriergeraden kann man für FCS (1:10 verdünnt, gemessene Extinktion: 0,156) eine Glucosekonzentration von ungefähr 0,525 mM ablesen. Unverdünntes FCS besitzt eine Glucosekonzentration von 5,25 mM.

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Herstellung von Medien mit 0,5 mM bzw. 10 mM Glucose

18.01.2007

Material:

- Analysenwaage
- Spatel
- Bechergläser 250 mL
- Messzylinder 250 mL
- Sicherheitswerkbank
- Zentrifugenröhrchen 50 mL
- Spritze 25 mL
- Sterilfilter

Chemikalien:

- DMEM - Pulver (Glucosefrei, NaHCO₃ - frei)
(9,12 g Pulver/L Medium),(NaHCO₃: 78 g/20L Medium)
- NaHCO₃
- Wasser
- Glucose * H₂O (M = 198 g/mol)

Durchführung:

Es wurde(n):

- Glucosefreies Medium hergestellt:
 - 2,28 g DMEM - Pulver in 250 mL Wasser gelöst
 - 0,975 g NaHCO₃ in den 250 mL Medium gelöst, und das Medium somit gepuffert
- Medium mit 10 mM Glucose hergestellt:
 - 2,280 g DMEM - Pulver in 250 mL Wasser gelöst
 - 0,975 g NaHCO₃ in den 250 mL Medium gelöst, und das Medium somit gepuffert
 - 0,495 g Glucose * H₂O in das Medium gegeben
- Die Medien jeweils mit 25 mL FCS versetzt
- Die Medien mit einem Sterilfilter zu je 40 mL in Zentrifugenröhrchen sterilfiltriert
- Die sterilen Medien in den Kühlschrank gestellt

Anmerkung:

Durch die Zugabe von 25 mL FCS sind die Molaritäten an Glucose in den beiden Medien auf 0,45 mM bzw. 9,55 mM verdünnt worden. Der Einfachheit halber werden die Medien aber unter der Bezeichnung 0,5 mM bzw. 10 mM Glucose weitergeführt.

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Splitten einer Kultur in drei große Kulturflaschen

23.01.2007

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10 mL)
- Zellinkubator
- Zentrifuge
- Eine Passage C6-Zellen in Kulturflasche
- Medium: DMEM 10% FCS
- Trypsin
- PBS
- Zentrifugenröhrchen
- Drei große Kulturflaschen

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkultur C6 P57 vom 16.01.2007: Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
- Medium der Kultur abgesaugt
- Zellen in 10 mL PBS gewaschen, nach ca. 1 min das PBS abgesaugt
- Zellen mit ca. 6 mL Trypsin abgelöst, durch leichte mechanische Schläge unterstützt
- In ein Zentrifugenröhrchen 20 mL Medium vorlegen, 6 mL Zellsuspension hinzugefügt
- 10 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute und 21°C zentrifugiert
- Überstand abgesaugt
- Pellet mit 10 mL PBS waschen um letzte Trypsinrückstände auszuwaschen, trituriert
- 6 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute und 21°C zentrifugiert
- Überstand abgesaugt
- 15 mL Medium auf Zellen geben, trituriert
- In drei große Kulturflaschen je 35 mL Medium vorgelegt
- In jede große Kulturflasche 5 mL Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen gegeben
- Die drei großen Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt

- Am 25.01.2007 festgestellt, dass alle drei Kulturen kontaminiert sind
- Die kontaminierten Kulturen für einen Versuch zu Daniel Peschutters Projektarbeit zu Verfügung gestellt.

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Qualitativer Nachweis von Hexokinase im Zellpellet

01.02.2007

Material:

- Zellpellet vom 14.12.2006 in Zentrifugenröhrchen
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L, 5 mL
- UV - Küvette
- Photometer
- Becherglas
- Zentrifuge

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Lysepuffer (10 mM Phosphatpuffer)
- Glucoselösung 1 M
- Testmischung (40 mM TEA, 8 mM $MgCl_2$, 0.9 mM $NADP^+$, 0.65 mM ATP)
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) (0.002 mg/mL)

Durchführung:

Es wurde(n):

- Das Zellpellet vom 14.12.2006 aufgetaut
- 1 mL 100 mM Phosphatpuffer 1:10 mit 9 mL Aqua demin. verdünnt und somit Lysepuffer hergestellt
- 4 mL Lysepuffer auf das Pellet gegeben und trituriert
- Die Zellen im Lysepuffer 5 min bei 4300 Umdrehungen und 21°C zentrifugiert
- 0,7 mL Testmischung, 0,1 mL 1M Glucoselösung und 0,1 mL G6PDH in eine UV – Küvette gegeben
- Die Küvette in ein Photometer gestellt und der Ansatz in der Küvette bei 366 nm als Nullwert geeicht
- 0,1 mL des Überstands des Zellpellets in die Küvette pipettiert
- Der Ansatz bei 366 nm vermessen
- Der Überstand in ein anderes Zentrifugenröhrchen dekantiert
- Der Zellschrott mit wenig Überstand 4 min bei 4000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert
- Der Überstand zum anderen Überstand in das Zentrifugenröhrchen pipettiert
- Zentrifugenröhrchen im Kühlschrank gelagert

Auswertung:

Innerhalb von 5 min stieg die Extinktion bei 366 nm von 0,00 auf 1,2.

Es wurde im Überstand des lysierten und zentrifugierten Zellpellets Hexokinase qualitativ nachgewiesen

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Medienwechsel bei drei Kulturen in großen Kulturflaschen

06.02.2007

Material:

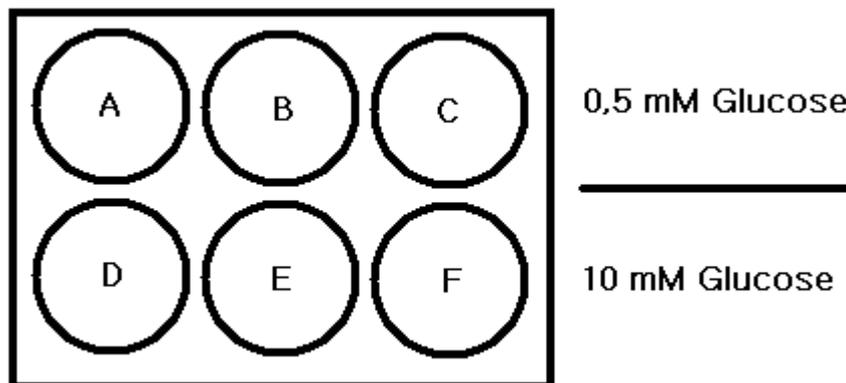
- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10mL)
- Zellinkubator
- Drei große Kulturflaschen mit C6-Zellen, die zuvor von Herrn Wiesinger angesät wurden
- Medien: DMEM 10% FCS: 0,5 mM, 10 mM und 25mM Glucose
Die Medien mit 0,5 mM und 10 mM Glucose sind in Zentrifugenröhrchen zu je 40 mL

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkulturen C6 P59 vom 02.02.2007: Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
- Das Medium aus einer großen Kulturflasche abgesaugt
- 40 mL DMEM 10% FCS, 25 mM Glucose ins Kulturflaschendach pipettiert
- Die Kulturflasche entsprechend der Glucosekonzentration im Medium markiert
- Das Medium der nächsten großen Kulturflasche abgesaugt
- 40 mL DMEM 10% FCS, 10 mM Glucose ins Kulturflaschendach geschüttet
- Die Kulturflasche entsprechend der Glucosekonzentration im Medium markiert
- Das Medium der nächsten großen Kulturflasche abgesaugt
- 40 mL DMEM 10% FCS, 0,5 mM Glucose ins Kulturflaschendach geschüttet
- Die Kulturflasche entsprechend der Glucosekonzentration im Medium markiert
- Die Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt

- Am 08.02.2007 festgestellt, dass die Kulturflaschen mit 0,5 mM und 10 mM Glucose kontaminiert sind
- Eine 6-Loch-Platte mit 2 mL-Stichproben aus den betreffenden Medien befüllt und in den Inkubator gestellt
- Befüllungsübersicht:



- Am 12.02.2007 festgestellt, dass alle Medien kontaminiert sind

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Splitten der übrigen Kultur in drei große Kulturflaschen und Sterilfiltrieren

12.02.2007

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10mL)
- Zellinkubator
- Zentrifuge
- Die nicht kontaminierte Kultur C6 P59 vom 02.02.2007
- Medien: DMEM 10% FCS: 0,5 mM, 10 mM und 25mM Glucose
- Trypsin
- Zentrifugenröhrchen
- Drei große Kulturflaschen
- Spritze 25 mL
- Sterilfilter

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkultur C6 P59 vom 02.02.2007: Medium ist gelb und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
- Medium der Kultur abgesaugt
- Zellen mit 10 mL Trypsin abgelöst, durch leichte mechanische Schläge unterstützt
- In ein Zentrifugenröhrchen 10 mL Medium vorlegen, 10 mL Zellsuspension hinzugefügt
- 10 min bei 1500 Umdrehungen und 21°C zentrifugiert
- Überstand abgesaugt
- 17 mL Medium auf Zellen geben, trituriert
- In drei große Kulturflaschen je 35 mL Medium vorgelegt
- In jede große Kulturflasche 5 mL Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen gegeben
- Die drei großen Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt
- 40 mL Medium 0,5 mM Glucose in ein Zentrifugenröhrchen sterilfiltriert
- 40 mL Medium 10 mM Glucose in ein Zentrifugenröhrchen sterilfiltriert

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Mediumwechsel bei den großen Kulturflaschen

15.02.2007

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10mL)
- Zellinkubator
- Medien: DMEM 10% FCS: 0,5 mM, 10 mM und 25mM Glucose
Die Medien mit 0,5 mM und 10 mM Glucose sind in Zentrifugenröhrchen zu je 40 mL
- Die großen Kulturflaschen C6 P60 vom 12.02.2007

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkultur C6 P60 vom 12.02.2007: Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
- Das Medium einer großen Kulturflasche abgesaugt
- 40 mL DMEM 10% FCS, 25 mM Glucose ins Kulturflaschendach pipettiert
- Die Kulturflasche entsprechend der Glucosekonzentration im Medium gekennzeichnet
- Das Medium der nächsten großen Kulturflasche abgesaugt
- 40 mL DMEM 10% FCS, 10 mM Glucose ins Kulturflaschendach pipettiert
- Die Kulturflasche entsprechend der Glucosekonzentration im Medium gekennzeichnet
- Das Medium der nächsten großen Kulturflasche abgesaugt
- 40 mL DMEM 10% FCS, 0,5 mM Glucose ins Kulturflaschendach pipettiert
- Die Kulturflasche entsprechend der Glucosekonzentration im Medium gekennzeichnet
- Die Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Zellernte und Lagerung der geernteten Zellen (durchgeführt von Herrn Wiesinger)

22.02.2007

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10mL)
- Gefrierschrank -18 °C
- Zentrifuge
- Trypsin
- Zentrifugenröhrchen
- Die großen Kulturflaschen C6 P60 vom 12.02.2007 mit 25 mM, 10 mM und 0,5 mM Glucose

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkulturen C6 P60 vom 12.02.2007 :
 - Kultur mit 25 mM Glucose: in Ordnung
 - Kultur mit 10 mM Glucose: in Ordnung
 - Kultur mit 0,5 mM Glucose: Zellen abgelöst, Medium rot bis violett
- Die Kultur mit 0,5 mM Glucose nicht weiterbehandelt
- Das Medium einer großen Kulturflasche abgesaugt
- Zellen mit ca. 10 mL Trypsin abgelöst, durch leichte mechanische Schläge unterstützt
- 10 mL Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen gegeben und mit dem Glucosegehalt beschriftet
- Schritte 3 - 5 für die andere große Kulturflasche wiederholt
- Die Zelldichte jeder Zellsuspension durch zählen bestimmt
- Die Zentrifugenröhrchen mit je 10 mL Zellsuspension in Trypsin 10 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute und 21°C zentrifugiert
- Der Überstand aus den Zentrifugenröhrchen abgesaugt
- Die Pellet in den Zentrifugenröhrchen eingefroren

Ergebnisse:

Die Zellsuspension mit 25 mM Glucose enthielt 620 Zellen in 4 Quadraten einer Neubauer-Zählkammer; Gesamtvolumen: 10 mL

Die Zellsuspension mit 10 mM Glucose enthielt 320 Zellen und Klumpen (ca. 100-200 Zellen) in 4 Quadraten einer Neubauer-Zählkammer; Gesamtvolumen: 10 mL

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Untersuchung, ob die Lagerung des Überstands im Kühlschrank geeignet ist

27.02.2007

Material:

- Zentrifugenröhrchen mit Hexokinase im Überstand vom 01.02.2007
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L, 5 mL
- UV - Küvette
- Photometer

Chemikalien:

- Glucoselösung 1 M
- Testmischung (40 mM TEA, 8 mM $MgCl_2$, 0.9 mM $NADP^+$, 0.65 mM ATP)
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) (0.002 mg/mL)

Durchführung:

Es wurde(n):

- 0,7 mL Testmischung, 0,1 mL 1M Glucoselösung und 0,1 mL G6PDH in eine UV – Küvette gegeben
- Die Küvette in ein Photometer gestellt und der Ansatz in der Küvette bei 366 nm als Nullwert geeicht
- 0,1 mL des Überstands vom 01.02.2007 in die Küvette pipettiert
- Der Ansatz bei 366 nm vermessen

Ergebnis:

Der Überstand hatte einen üblen Geruch, und es konnte keine Aktivität der Hexokinase nachgewiesen werden. Die Lagerung des Überstandes im Kühlschrank ist ungeeignet. Einfrieren der Pellets scheint sinnvoller zu sein.

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Herauslösen der Hexokinase aus den Zellpellets

27.02.2007

Material:

- Zellpellets vom 22.02.2007 in Zentrifugenröhrchen
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L, 5 mL
- Zentrifugenröhrchen
- Zentrifuge

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Lysepuffer (10 mM Phosphatpuffer)

Durchführung:

Es wurde(n):

- Die Zellpellet vom 22.02.2007 aufgetaut
- 1 mL 100 mM Phosphatpuffer 1:10 mit 9 mL Aqua demin. verdünnt und somit Lysepuffer hergestellt
- 2 mL Lysepuffer auf jedes Pellet gegeben und trituriert
- Die Zellen im Lysepuffer 10 min bei 4300 Umdrehungen und 21°C zentrifugiert
- Die Überstände je in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert
- Die Überstände eingefroren

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Bestimmung des Gesamtproteingehalts in den Überständen

27.02.2007

Material:

- Zwei Zentrifugenröhrchen mit Hexokinase im Überstand vom 27.02.2007
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL, 5 mL
- Eppendorfcups
- Halbmikro - Küvette
- Photometer
- Bechergläser

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Bradfordreagenz
- RSA - Eichlösung (Rinderserumalbuminlösung) 1 mg/mL

Durchführung:

Es wurde(n):

- 2 µL jedes Überstandes mit 98 µL Aqua demin. vorverdünnt (1:50)
- Die RSA - Eichlösung 1:10 mit Aqua demin. verdünnt (100 µL RSA - Lösung + 900 µL H₂O)
- Mit der verdünnten RSA - Lösung Eichstandards hergestellt
- Testansätze mit den Proben hergestellt, bei denen die Proben 1:200 verdünnt wurden
- Die Bradfordreagenz 1:5 verdünnt (16 mL H₂O + 4 mL Bradfordreagenz)
- Auf die Testansätze und die Eichstandards je 0,9 mL Bradfordreagenz gegeben
- Das Photometer mit dem Leerwert auf Null geeicht
- Die Ansätze und Standards bei 578 nm vermessen

Auswertung:

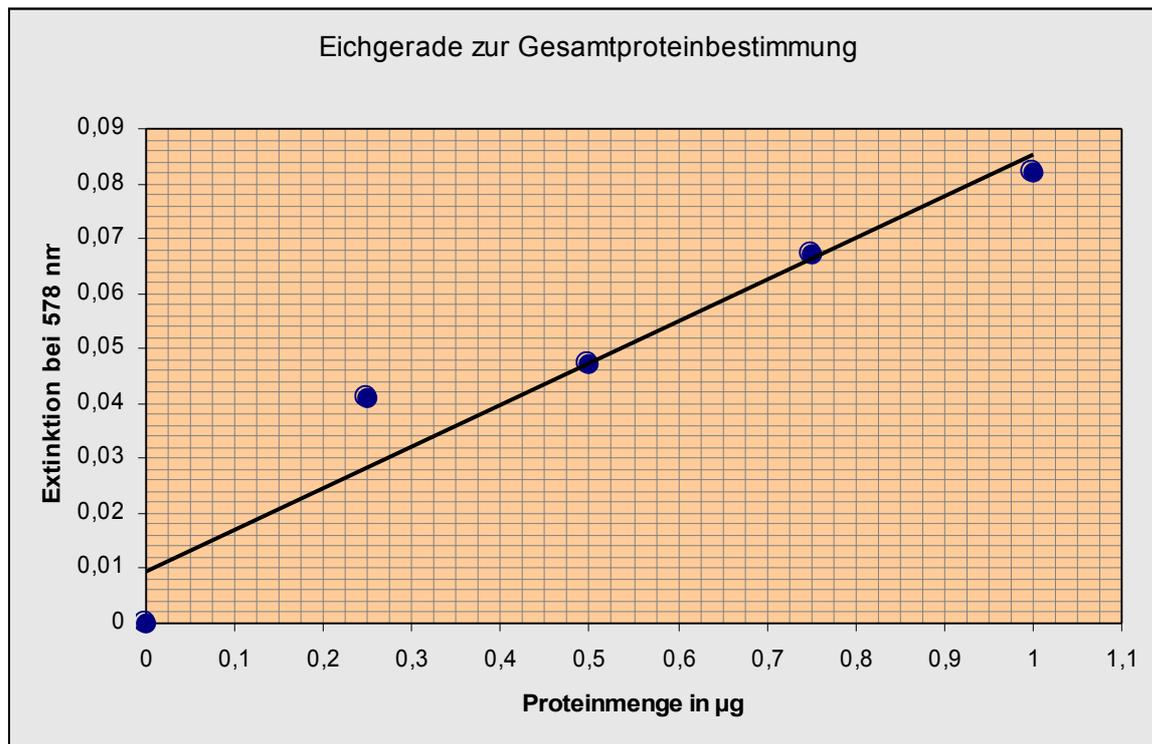
Ansatzschema:

Standard	Aqua demin.	RSA - Lösung 10 µg/mL		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
Leerwert	100 µL	0,0 µL	0,00 µg	900 µL	0
S1	97,5 µL	2,5 µL	0,25 µg	900 µL	0,041
S2	95,0 µL	5,0 µL	0,50 µg	900 µL	0,047
S3	92,5 µL	7,5 µL	0,75 µg	900 µL	0,067
S4	90,0 µL	10 µL	1,00 µg	900 µL	0,082
Probe	Aqua demin.	Vorverdünnte Probe		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
P25	95 µL	5 µL		900 µL	0,064
P10	95 µL	5 µL		900 µL	0,042

P25 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 25 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde,

P10 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 10 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde.

Graphische Auswertung:



P25 lieferte eine Extinktion von 0,064 und hat daher eine Proteinmenge von 0,713 μg in der Kuvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 0,713 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

P10 lieferte eine Extinktion von 0,042 und hat daher eine Proteinmenge von 0,428 μg in der Kuvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 0,428 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Insgesamt wurden beide Proben 1:10000 verdünnt. Daraus ergeben sich folgende Proteinkonzentrationen in den Überständen:

Der Überstand der Zellen mit 25 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 7,13 mg/mL
Der Überstand der Zellen mit 10 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 4,28 mg/mL

Ergebnis:

Aus dem Pellet der Zellen, die einem Medium mit 25 mM Glucose ausgesetzt waren, konnten mit 2 mL Lysepuffer 14,26 mg Protein gewonnen werden.

Aus dem Pellet der Zellen, die einem Medium mit 10 mM Glucose ausgesetzt waren, konnten mit 2 mL Lysepuffer 8,650 mg Protein gewonnen werden.

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Ansäen zweier Kulturflaschen mit aufgetauten Zellen

27.02.2007

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10 mL)
- Zellinkubator
- Zwei Kryoröhrchen mit je 1 mL gefrorener C6-Zellsuspension
- Medium: DMEM 10% FCS
- zwei Kulturflaschen

Durchführung:

Es wurde(n):

- In beiden Kulturflaschen je 20 mL Medium vorgelegt
- Die Kryoröhrchen C6 P56 vom 14.03.2006 im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut
- Die Kryoröhrchen mit Ethanol abgewischt und anschließend abgeflammt
- Die Zellsuspension aus einem Kryoröhrchen in eine Kulturflasche pipettiert
- Die Zellsuspension aus dem anderen Kryoröhrchen in die andere Kulturflasche pipettiert
- Die beiden Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt
- Nach 32 min eine mikroskopische Prüfung durchgeführt, ob die Zellen angewachsen sind
- Das Medium einer Kulturflasche abgesaugt
- 20 mL neues Medium in die Kulturflasche gegeben
- Das Medium der anderen Kulturflasche abgesaugt
- 20 mL neues Medium in die Kulturflasche gegeben
- Die Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Ansäen zweier Kulturflaschen mit aufgetauten Zellen

02.03.2007

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10 mL)
- Zellinkubator
- Zwei Kryoröhrchen mit je 1 mL gefrorener C6-Zellsuspension
- Medium: DMEM 10% FCS
- zwei Kulturflaschen

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkulturen C6 P56 vom 27.02.2007:
 - Medium der einen Kultur ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
 - Die andere Kultur ist kontaminiert, die Zellen sind abgelöst
- In die beiden neuen Kulturflaschen je 20 mL Medium vorgelegt
- Die Kryoröhrchen C6 P56 vom 14.03.2006 im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut
- Die Kryoröhrchen mit Ethanol abgewischt und anschließend abgeflammt
- Die Zellsuspension aus einem Kryoröhrchen in eine Kulturflasche pipettiert
- Die Zellsuspension aus dem anderen Kryoröhrchen in die andere Kulturflasche pipettiert
- Die beiden Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt
- Nach 32 min eine mikroskopische Prüfung durchgeführt, ob die Zellen angewachsen sind
- Das Medium einer Kulturflasche abgesaugt
- 20 mL neues Medium in die Kulturflasche gegeben
- Das Medium der anderen Kulturflasche abgesaugt
- 20 mL neues Medium in die Kulturflasche gegeben
- Die Kulturflaschen in den Zellinkubator gestellt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Medienwechsel bei drei Kulturen

05.03.2007

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10 mL)
- Zellinkubator
- Drei Kulturflaschen mit C6-Zellen, zwei vom 02.03.2007 und eine vom 27.02.2007
- Medium: DMEM 10% FCS

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkulturen C6 P59 vom 02.03.2007 und 27.02.2007:
Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
- Das Medium aus einer Kulturflasche abgesaugt
- 20 mL DMEM 10% FCS Kulturflaschendach pipettiert
- Schritte 2 - 3 für die anderen beiden Kulturflaschen wiederholt
- Die Kulturflaschen in den Inkubator gestellt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Medienwechsel bei drei Kulturen, zweimal 25 mM, einmal 0,5 mM Glucose

08.03.2007

Material:

- Sicherheitswerkbank mit sterilen Pipetten (1 mL und 10 mL)
- Zellinkubator
- Drei Kulturflaschen mit C6-Zellen, zwei vom 02.03.2007 und eine vom 27.02.2007
- Medien: DMEM 10% FCS: 0,5 und 25 mM Glucose

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkulturen C6 P59 vom 02.03.2007 und 27.02.2007:
Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
 - Beide Kulturflaschen vom 02.03.2007 sind zu 50% bewachsen
 - Die Kulturflasche vom 27.02.2007 ist zu 75% bewachsen
- 20 mL Medium mit 0,5 mM Glucose sterilfiltriert
- Das Medium aus der Kulturflasche vom 27.02.2007 abgesaugt
- 20 mL DMEM 10% FCS, 25 mM Glucose ins Kulturflaschendach pipettiert
- die Kulturflasche geschlossen und in den Inkubator gestellt
- Schritte 3 - 5 für eine Kultur vom 02.03.2007 wiederholt
- Das Medium aus der übrigen Kulturflasche abgesaugt
- 20 mL DMEM 10% FCS, 0,5 mM Glucose ins Kulturflaschendach pipettiert
- die Kulturflasche geschlossen und in den Inkubator gestellt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Begutachtung der Kulturen mit 25 mM und 0,5 mM Glucose

12.03.2007

Material:

- Mikroskop

Durchführung:

Es wurde(n):

- Qualitative Beurteilung der Zellkulturen C6 P59 vom 02.03.2007:
 - 25 mM Glucose: Medium ist orange und klar, mikroskopische Prüfung ist in Ordnung
 - 0,5 mM Glucose: Medium ist orange und klar Zellen sind klein, rund und teilweise abgelöst

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Untersuchung, ob Hexokinase nach Einfrieren im Überstand stabil bleibt

12.03.2007

Material:

- Überstand vom 27.02.2006 in Zentrifugenröhrchen
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L
- UV - Küvette
- Photometer
- Becherglas

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Lysepuffer (10 mM Phosphatpuffer)
- Glucoselösung 1 M
- Testmischung (40 mM TEA, 8 mM $MgCl_2$, 0.9 mM $NADP^+$, 0.65 mM ATP)
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) (0.002 mg/mL)

Durchführung:

Es wurde(n):

- 0,75 mL Testmischung, 0,05 mL 1M Glucoselösung und 0,1 mL G6PDH in eine UV – Küvette gegeben
- Die Küvette in ein Photometer gestellt und der Ansatz in der Küvette bei 366 nm als Nullwert geeicht
- 0,1 mL des Überstands des Zellpellets in die Küvette pipettiert
- Der Ansatz bei 366 nm vermessen

Auswertung:

Innerhalb von 10 min stieg die Extinktion bei 366 nm von 0,00 auf 0,294.
Es wurde im aufgetauten Überstand Hexokinase nachgewiesen

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Herstellung von Blue Sepharose Gel CL 6B

12.03.2007

Material:

- Analysenwaage
- Spatel
- 250 mL Erlenmeyerkolben
- Parafilm
- Kühlschrank

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Blue Sepharose Gel CL 6B Pulver

Durchführung:

Es wurde(n):

- 1 g Blue Sepharose Pulver in den Erlenmeyerkolben eingewogen
- 200 ml Aqua demin. In den Erlenmeyerkolben gegeben
- Der Ansatz zum Quellen über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Bindung der Hexokinase in Blue Sepharose Gel CL 6B

13.03.2007

Material:

- Gequollenes Sepharose Gel
- Überstände mit Hexokinase vom 27.02.2007
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L
- Eppendorfcups 1,5 mL
- Zentrifuge für Eppendorfcups
- Vortexer
- UV - Küvette
- Photometer

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Glucoselösung 1 M
- Testmischung (40 mM TEA, 8 mM $MgCl_2$, 0.9 mM $NADP^+$, 0.65 mM ATP)
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) (0.002 mg/mL)

Durchführung:

Es wurde(n):

- Je 500 μ L gequollenes Gel in zwei Eppendorfcups pipettiert
- Die Eppendorfcups mit dem Gel 2 min bei 7,2 g zentrifugiert
- Der Überstand (ca. 200 μ L) abpipettiert und verworfen
- In ein Eppendorfcup mit Gel 500 μ L des Überstands mit Hexokinase von 10 mM Glucosebehandelten Zellen pipettiert
- In das andere Eppendorfcup mit Gel 500 μ L des Überstands mit Hexokinase von 25 mM Glucosebehandelten Zellen pipettiert
- Beide Eppendorfcups gevortext
- Die Eppendorfcups 2 min bei 3,5 g zentrifugiert
- 0,75 mL Testmischung, 0,05 mL 1M Glucoselösung und 0,1 mL G6PDH in eine UV – Küvette gegeben
- Die Küvette in ein Photometer gestellt und der Ansatz in der Küvette bei 366 nm als Nullwert geeicht
- 0,1 mL des Überstands aus dem zentrifugierten Eppendorfcup mit der Hexokinase aus 10 mM Glucosebehandelten Zellen in die Küvette pipettiert
- Der Ansatz bei 366 nm vermessen
- 0,75 mL Testmischung, 0,05 mL 1M Glucoselösung und 0,1 mL G6PDH in eine UV – Küvette gegeben
- Die Küvette in ein Photometer gestellt und der Ansatz in der Küvette bei 366 nm als Nullwert geeicht
- 0,1 mL des Überstands aus dem zentrifugierten Eppendorfcup mit der Hexokinase aus 25 mM Glucosebehandelten Zellen in die Küvette pipettiert
- Der Ansatz bei 366 nm vermessen

Auswertung:

In beiden Ansätzen konnte eine Extinktionsanstieg von durchschnittlich 4 mOD pro 15 Sekunden gemessen werden. Das bedeutet, dass im Überstand noch immer Hexokinase vorhanden ist.

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Bindung der Hexokinase in Blue Sepharose Gel CL 6B

13.03.2007

Material:

- Gequollenes Sepharose Gel
- Überstände mit Hexokinase vom 27.02.2007
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μL , 100 - 1000 μL
- Eppendorfcups 1,5 mL
- Zentrifuge für Eppendorfcups
- Vortexer
- UV - Küvette
- Photometer
- Becherglas
- Kühlschrank

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Glucoselösung 1 M
- Testmischung (40 mM TEA, 8 mM MgCl_2 , 0.9 mM NADP^+ , 0.65 mM ATP)
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) (0.002 mg/mL)

Durchführung:

Es wurde(n):

- Je 1000 μL gequollenes Gel in zwei Eppendorfcups pipettiert
- Die Eppendorfcups mit dem Gel 2 min bei 7,2 g zentrifugiert
- Der Überstand abpipettiert und verworfen
- In ein Eppendorfcup mit Gel 50 μL des Überstands mit Hexokinase vom vorhergegangenen, aber missglückten Versuch pipettiert und 50 μL Aqua demin. hinzugefügt
- Das Eppendorfcup gevortext
- Das Eppendorfcup 1 min bei 3,5 g zentrifugiert
- 0,75 mL Testmischung, 0,05 mL 1M Glucoselösung und 0,1 mL G6PDH in eine UV – Küvette gegeben
- Die Küvette in ein Photometer gestellt und der Ansatz in der Küvette bei 366 nm als Nullwert geeicht
- 0,1 mL des Überstands aus dem zentrifugierten Eppendorfcup mit der Hexokinase aus 10 mM Glucosebehandelten Zellen in die Küvette pipettiert
- Der Ansatz bei 366 nm vermessen
- Das Eppendorfcup mit der gebundenen Hexokinase im Kühlschrank gelagert

Auswertung:

Es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden, Die Hexokinase wurde im Gel gebunden

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Herstellung von Blue Sepharose Gel CL 6B

13.03.2007

Material:

- Analysenwaage
- Spatel
- 250 mL Erlenmeyerkolben
- Parafilm
- Kühlschrank

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Blue Sepharose Gel CL 6B Pulver

Durchführung:

Es wurde(n):

- 1,3 g Blue Sepharose Pulver in den Erlenmeyerkolben eingewogen
- 250 ml Aqua demin. In den Erlenmeyerkolben gegeben
- Der Ansatz zum Quellen im Kühlschrank aufbewahrt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Herstellung einer 50 mM Glucose-6-Phosphat-Lösung

14.03.2007

Material:

- Analysenwaage
- Spatel
- Kleines Zentrifugenröhrchen
- Kühlschrank

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Dinatrium-Glucose-6-Phosphat ($M = 304,2 \text{ g/mol}$)

Durchführung:

Es wurde(n):

- Berechnet:
 - 1,512 g Dinatrium-Glucose-6-Phosphat in 5 mL Aqua demin. entspricht 1 M
 - 0,07605 g Dinatrium-Glucose-6-Phosphat in 5 mL Aqua demin. entspricht 50 mM
- 0,089 g Dinatrium-Glucose-6-Phosphat in ein kleines Zentrifugenröhrchen eingewogen und in 5,85 mL Aqua demin. gelöst
- die Glucose-6-Phosphat-Lösung im Kühlschrank aufbewahrt

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Elution der Hexokinase aus Blue Sepharose Gel CL 6B und Dialyse

15.03.2007

Material:

- In Sepharose Gel gebundene Hexokinase vom 13.03.2007
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L
- Eppendorfcups 1,5 mL
- Zentrifuge für Eppendorfcups
- Vortexer
- Becherglas 1 L
- Messzylinder 100 mL
- Dialyseschlauch
- Kühlschrank

Chemikalien:

- Aqua demin.
- 100 mM Phosphatpuffer

Durchführung:

Es wurde(n):

- Gel mit Hexokinase in Eppendorfcups 1 min bei 3,5 g zentrifugiert um Gel zu sedimentieren
- 20 μ L 50 mM Glucose-6-Phosphat-Lösung mit 980 μ L Aqua demin. verdünnt
- 500 μ L 1 mM Glucose-6-Phosphat-Lösung auf das Gel gegeben
- Das Eppendorfcup mit dem Gel gevortext
- Das Eppendorfcup 1 min bei 3,5 g zentrifugiert
- 200 mL 100 mM Phosphatpuffer mit 800 mL Aqua demin. in einem 1 L Becherglas verdünnt
- Mit einem heißen Spatel ein Loch in den Deckel eines Eppendorfcups geschmolzen
- 300 μ L des Überstandes mit der eluierten Hexokinase in das Eppendorfcup mit Loch gegeben
- Zwischen das Eppendorfcup und den Deckel mit Loch ein Stück einlagigen Dialyseschlauch = Dialysemembran gebracht und den Deckel geschlossen
- Das Eppendorfcup in einen Styroporschwimmer gesteckt und die Seite mit dem Loch im Deckel in dem 1 L 20 mM Phosphatpuffer untergetaucht
- Der Dialyseansatz im Kühlschrank gelagert

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Untersuchung der dialysierten Proteinlösung auf Hexokinaseaktivität

16.03.2007

Material:

- Dialyseansatz vom 15.03.2007
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 μ L, 100 - 1000 μ L
- UV - Küvette
- Photometer

Chemikalien:

- Glucoselösung 1 M
- Testmischung (40 mM TEA, 8 mM $MgCl_2$, 0.9 mM $NADP^+$, 0.65 mM ATP)
- Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PDH) (0.002 mg/mL)

Durchführung:

Es wurde(n):

- 0,75 mL Testmischung, 0,05 mL 1M Glucoselösung und 0,1 mL G6PDH in eine UV – Küvette gegeben
- Die Küvette in ein Photometer gestellt und der Ansatz in der Küvette bei 366 nm als Nullwert geeicht
- 0,1 mL des Dialyseansatzes vom 15.03.2007 Zellen in die Küvette pipettiert
- Der Ansatz bei 366 nm vermessen

Auswertung:

Es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden, es war keine Hexokinase im Dialyseansatz vorhanden

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Bestimmung des Hexokinasegehalts in den Überständen

20.03.2007

Material:

- Zwei Zentrifugenröhrchen mit Hexokinase im Überstand vom 27.02.2007
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL, 5 mL
- Halbmikro - Küvette
- Photometer
- Bechergläser
- Gequollenes Sepharose Gel in zwei Eppendorfcups
- Zentrifuge für Eppendorfcups
- Vortexer

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Bradfordreagenz
- RSA - Eichlösung (Rinderserumalbuminlösung) 1 mg/mL
- 10 mM Phosphatpuffer
- 1 mM Glucose-6-Phosphat-Lösung

Durchführung:

Es wurde(n):

- Sepharose Gel in Eppendorfcups einmal mit PBS und zweimal mit 10 mM Phosphatpuffer gewaschen
- 500 µL der Überstände vom 27.02.2007 und 1 mL 10 mM Phosphatpuffer in je ein Eppendorfcup mit Gel gegeben
- Gevortext
- 1 min bei 4300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert
- Überstand aufbewahrt = Ü1
- 1 mL 1 mM Glucose-6-Phosphat auf jedes Gel gegeben
- Gevortext
- 1 min bei 4300 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert
- Überstand aufbewahrt = Ü2
- Mit der RSA - Lösung Eichstandards hergestellt
- Testansätze mit den Überständen Ü1 und Ü2 hergestellt, bei denen die Überstände 1:200 verdünnt wurden
- Die Bradfordreagenz 1:5 verdünnt (16 mL H₂O + 4 mL Bradfordreagenz)
- Auf die Testansätze und die Eichstandards je 0,9 mL Bradfordreagenz gegeben
- Das Photometer mit dem Leerwert auf Null geeicht
- Die Ansätze und Standards bei 578 nm vermessen

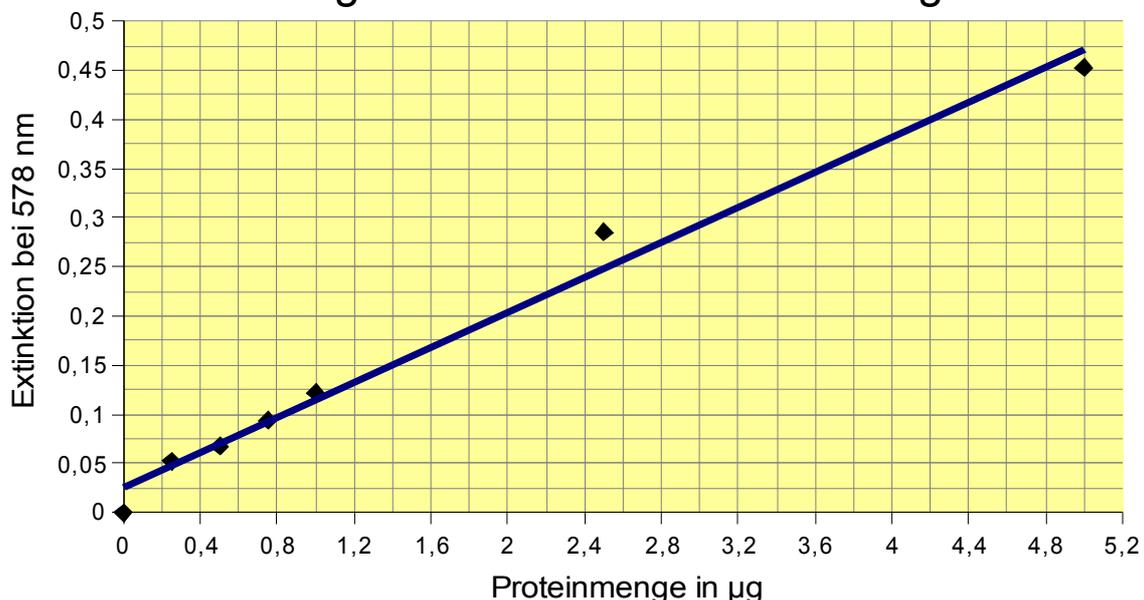
Auswertung:
 Ansatzschema:

Standard	Aqua demin.	RSA-Lösung 0,1 mg/mL	Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm	
Leerwert	100 µL	0,0 µL	0,00 µg	900 µL	0
S1	97,5 µL	2,5 µL	0,25 µg	900 µL	0,052
S2	95,0 µL	5,0 µL	0,50 µg	900 µL	0,068
S3	92,5 µL	7,5 µL	0,75 µg	900 µL	0,094
S4	90,0 µL	10 µL	1,00 µg	900 µL	0,122
Standard	Aqua demin.	RSA - Lösung 1 mg/mL	Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm	
S5	97,5 µL	2,5 µL	2,50 µg	900 µL	0,285
S6	95,0 µL	5,0 µL	5,00 µg	900 µL	0,452
Probe	Aqua demin.	Überstand	Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm	
P10Ü1	95 µL	5 µL	900 µL	0,249	
P10Ü2	95 µL	5 µL	900 µL	0,151	
P25Ü1	95 µL	5 µL	900 µL	0,290	
P25Ü2	95 µL	5 µL	900 µL	0,149	

P25 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 25 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde,
 P10 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 10 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde.

Graphische Auswertung:

Eichgerade zur Proteinbestimmung



P10Ü1 lieferte eine Extinktion von 0,249 und hat daher eine Proteinmenge von 2,5 µg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 2,5 µg/mL.
 P10Ü2 lieferte eine Extinktion von 0,151 und hat daher eine Proteinmenge von 1,4 µg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 1,4 µg/mL.
 P25Ü1 lieferte eine Extinktion von 0,290 und hat daher eine Proteinmenge von 2,95 µg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 2,95 µg/mL.
 P25Ü2 lieferte eine Extinktion von 0,149 und hat daher eine Proteinmenge von 1,4 µg in der Küvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 1,4 µg/mL.

Insgesamt wurden alle Proben 1:600 verdünnt. Daraus ergeben sich folgende Proteinkonzentrationen in den Überständen:

Ü1 der Zellen mit 10 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 1,50 mg/mL

Ü2 der Zellen mit 10 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 0,84 mg/mL

Ü1 der Zellen mit 25 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 1,77 mg/mL

Ü2 der Zellen mit 25 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 0,84 mg/mL

Ü1 steht für die Proteine, die nicht im Gel binden

Ü2 steht für die eluierte Hexokinase

Ergebnis:

3,00 mg der Proteine aus den Zellen mit 10 mM Glucose binden sich nicht im Gel

3,54 mg der Proteine aus den Zellen mit 25 mM Glucose binden sich nicht im Gel

Beide Zellkulturen haben 1,68 mg Hexokinase produziert

„Auswirkung des Glucosegehalts eines Mediums auf die Hexokinaseproduktion von C6-Zellen“

Bestimmung des Gesamtproteingehalts in den Überständen

22.03.2007

Material:

- Zwei Zentrifugenröhrchen mit Hexokinase im Überstand vom 27.02.2007
- Eppendorf Pipetten 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL, 5 mL
- Eppendorfcups
- Halbmikro - Küvette
- Photometer
- Bechergläser

Chemikalien:

- Aqua demin.
- Bradfordreagenz
- RSA - Eichlösung (Rinderserumalbuminlösung) 1 mg/mL

Durchführung:

Es wurde(n):

- 10 µL jedes Überstandes mit 90 µL Aqua demin. vorverdünnt (1:10)
- Mit der RSA - Lösung Eichstandards hergestellt
- Testansätze mit den Proben hergestellt, bei denen die Proben 1:200 verdünnt wurden
- Die Bradfordreagenz 1:5 verdünnt (16 mL H₂O + 4 mL Bradfordreagenz)
- Auf die Testansätze und die Eichstandards je 0,9 mL Bradfordreagenz gegeben
- Das Photometer mit dem Leerwert auf Null geeicht
- Die Ansätze und Standards bei 578 nm vermessen

Auswertung:

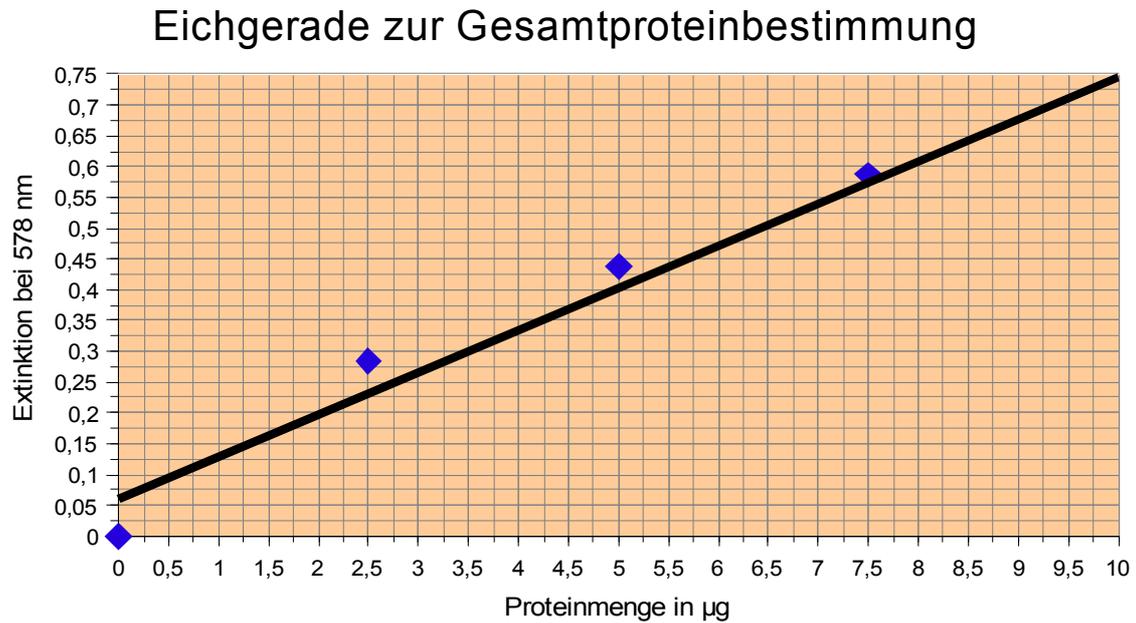
Ansatzschema:

Standard	Aqua demin.	RSA - Lösung 1 mg/mL		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
Leerwert	100 µL	0,0 µL	0,00 µg	900 µL	0
S1	97,5 µL	2,5 µL	2,5 µg	900 µL	0,285
S2	95,0 µL	5,0 µL	5,0 µg	900 µL	0,437
S3	92,5 µL	7,5 µL	7,5 µg	900 µL	0,587
S4	90,0 µL	10 µL	10 µg	900 µL	0,706
Probe	Aqua demin.	Vorverdünnte Probe		Bradfordreagenz	Extinktion bei 578 nm
P25	95 µL	5 µL		900 µL	0,297
P10	95 µL	5 µL		900 µL	0,276

P25 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 25 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde,

P10 steht für die Probe, die aus dem Überstand der Zellen, die mit 10 mM Glucose behandelt wurde, gewonnen wurde.

Graphische Auswertung:



P25 lieferte eine Extinktion von 0,297 und hat daher eine Proteinmenge von 3,5 μg in der Kuvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 3,5 $\mu\text{g/mL}$.

P10 lieferte eine Extinktion von 0,276 und hat daher eine Proteinmenge von 3,13 μg in der Kuvette. Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration von 3,13 $\mu\text{g/mL}$.

Insgesamt wurden beide Proben 1:2000 verdünnt. Daraus ergeben sich folgende Proteinkonzentrationen in den Überständen:

Der Überstand der Zellen mit 25 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 7,00 mg/mL

Der Überstand der Zellen mit 10 mM Glucose hat eine Proteinkonzentration von 6,26 mg/mL

Ergebnis:

Aus dem Pellet der Zellen, die einem Medium mit 25 mM Glucose ausgesetzt waren, konnten mit 2 mL Lysepuffer 14,00 mg Protein gewonnen werden.

Aus dem Pellet der Zellen, die einem Medium mit 10 mM Glucose ausgesetzt waren, konnten mit 2 mL Lysepuffer 12,52 mg Protein gewonnen werden.