

Fachtheorie nach Lernfeldern für Chemielaboranten – Teil 3

Biochemische und mikrobiologische Inhalte
3. und 4. Ausbildungsjahr

Angelika Janß

Lösungen



Best.-Nr. 1625

Holland + Josenhans Verlag Stuttgart

1. Auflage 2013

Die Normblattangaben werden wiedergegeben nach DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Maßgebend für das Anwenden der Norm ist deren Fassung mit dem neuesten Ausgabedatum, die bei der Beuth Verlag GmbH, Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, erhältlich ist.

Dieses Werk folgt der reformierten Rechtschreibung und Zeichensetzung.

Das Werk und seine Teile sind urheberrechtlich geschützt. Jede Nutzung in anderen als den gesetzlich oder durch bundesweite Vereinbarungen zugelassenen Fällen bedarf der vorherigen schriftlichen Einwilligung des Verlages.

Die Verweise auf Internetadressen und -dateien beziehen sich auf deren Zustand und Inhalt zum Zeitpunkt der Drucklegung des Werks. Der Verlag übernimmt keinerlei Gewähr und Haftung für deren Aktualität oder Inhalt noch für den Inhalt von mit ihnen verlinkten weiteren Internetseiten.

© Holland+Josenhans GmbH & Co. KG, Postfach 102352, 70019 Stuttgart, 2011

Telefon: 07 11/6 14 39 15, Fax: 07 11/6 14 39 22

E-Mail: verlag@holland-josenhans.de

Internet: www.holland-josenhans.de

Umschlagabbildungen: adpic Bildagentur, 53121 Bonn;

CMS – Cross Media Solutions GmbH, 97080 Würzburg

Technische Umsetzung: CMS – Cross Media Solutions GmbH, 97080 Würzburg

Druck und Bindung: Beltz Druckpartner GmbH & Co. KG, Hemsbach

ISBN: 978-3-7782-1625-5

1 Charakterisierung und Untersuchung lebender Zellen und ihrer Inhaltsstoffe

1. Zellen von

Tieren	Pflanzen	Pilzen	Bakterien
Zellmembran	Zellmembran	Zellmembran	Zellmembran
Zellkern	Zellkern	Zellkern	–
–	Zellwand aus Cellulose	Zellwand aus Chitin	Zellwand aus Murein
Mitochondrien	Mitochondrien	Mitochondrien	–
–	Chloroplasten	–	–
Ribosomen	Ribosomen	Ribosomen	Ribosomen

2. Mitochondrien: Zellatmung, Energiegewinnung

Chloroplasten: Fotosynthese

Ribosomen: Proteinbiosynthese

3. Proteine: Peptidbindung (Carbonsäureamid)

Fette: Carbonsäureester, olefinische Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren

Polysaccharide: primäre und sekundäre alkoholische OH-Gruppen
Halbacetalgruppe im Ring der Monosaccharideinheiten
Acetal (Etherbrücke) bei der glykosidischen Bindung

Nucleinsäuren: Phosphorsäureester
Amino- und Amidogruppen in den Stickstoffbasen

4. a) Abbildungsoptik:

Objektiv: erzeugt ein vergrößertes, reelles Zwischenbild

Okular: erzeugt ein vergrößertes virtuelles Endbild

b) Beleuchtungsoptik:

Lampe: Lichtquelle

Kollektor: vergrößert die Lichtquelle und projiziert sie auf den Kondensator

Kondensator: sammelt das Licht und überträgt es im optimalen Öffnungswinkel durch das Präparat zum Objektiv

Kondensatorblende: verändert den Öffnungswinkel

5. $V = V_{Ob} \cdot V_{Ok}$

a) Objektiv: 10×, Okular: 40× **V = 400×**

b) Objektiv: 100×, Okular: 10× **V = 1000×**

6. Das Aufschlussmedium muss Puffer, Saccharose und Stabilisatoren enthalten.

Beim Aufschluss muss gekühlt werden.

7. $RZB = 1,117 \cdot 10^{-5} \cdot (\text{Upm})^2 \cdot r \quad (\cdot \text{ g})$

$$RZB = 1,117 \cdot 10^{-5} \cdot (8000)^2 \cdot 8,7 = \mathbf{6219 (\cdot \text{ g})}$$

8. $\text{Upm} = 1000 \cdot \sqrt{\frac{RZB}{11,17 \cdot r}} = 1000 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot 10^4}{11,17 \cdot 6,5}} = \mathbf{16597 \text{ min}^{-1}}$

2 Durchführung mikrobiologischer Arbeiten

1. C-heterotroph, chemo-organo-heterotroph, obligat anaerob, mesophil

2. pH-Wert leicht sauer einstellen.

3. Fleischextrakt und Pepton: Quelle für C, N, Vitamine und Mineralstoffe.

NaCl: Ionenkonzentration der Zelle.

Lactose: C-Quelle, nur von einigen Bakterien nutzbar, daher Selektivnährboden.

Fuchsin und Natriumsulfit: Bestandteile des Nachweisreagenzes für Aldehyde aus dem Stoffwechsel, daher Differenzierungsnährboden.

Agar-Agar: Verfestigungsmittel.

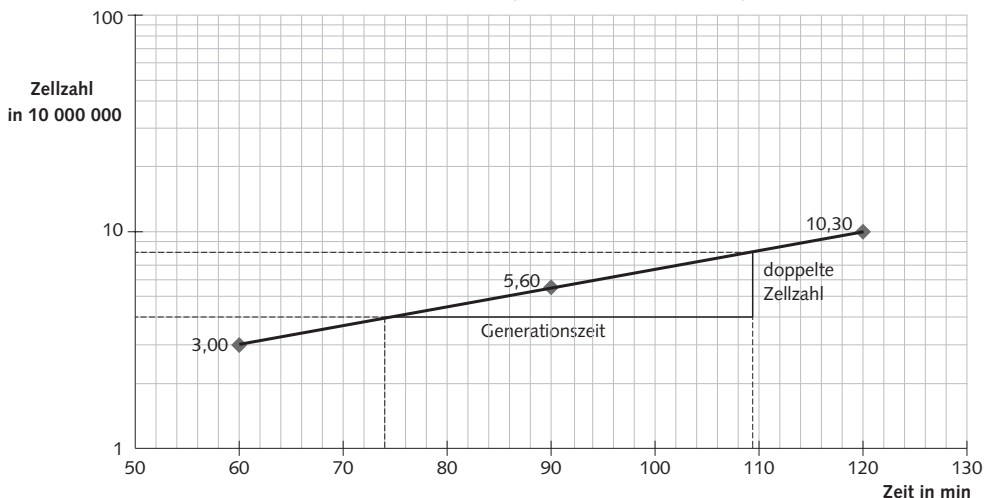
4. a) $N = N_0 \cdot 2^n$

Nach 24 Stunden haben 12 Teilungen stattgefunden.

$$N = 8 \cdot 10^6 \cdot 2^{12} = 3,3 \cdot 10^{10} \text{ Zellen.}$$

b) Nährstoffverknappung, Absterben einiger Zellen ...

5. Wachstumskurve in halblogarithmischer Darstellung



Aus der Wachstumskurve lässt sich eine Generationszeit von etwa 35 min ablesen.

Eine rechnerische Lösung kann über die Gleichungen S. 50 erfolgen.

Die Anzahl der Zellteilungen n wird nach folgender Formel aus der Zellzahl zu Beginn N_0 und am Ende der Teilungen N gemäß Gleichung 2 errechnet:

$$n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2}$$

$$n = \frac{\lg 10,3 \cdot 10^7 - \lg 3,0 \cdot 10^7}{\lg 2} = \frac{8,013 - 7,477}{0,301} = \frac{0,536}{0,301} = 1,781$$

Die Generationszeit g ist mit der Zeit t über die Anzahl der Zellteilungen n verknüpft gemäß Gleichung 4:

$$g = \frac{t}{n} \quad g = \frac{60 \text{ min}}{1,781} = \mathbf{33,7 \text{ min}}$$

6. Raumlufte: Arbeiten unter der Werkbank, UV-Bestrahlung nachts.
Nährmedien: Autoklavieren.
Arbeitsflächen: Ethanol oder Propanole.
Glasgeräte: Heißluftschrank.
Enzymlösungen: Sterilfiltration.
7. • Schimmelpilze: **Exosporen** werden an den Enden der Sporenträger (Lufthyphen) gebildet und dienen der ungeschlechtlichen Vermehrung.
• Bakterien: **Endosporen** werden im Inneren der Zelle durch Wasserverlust und dicke Hüllen gebildet und dienen als Dauerformen dem Überleben unter schlechten Bedingungen.
8. • **Schimmelpilze**: ungeschlechtlich durch Exosporen, die an Sporenträgern gebildet und nach außen abgegeben werden. Auch geschlechtliche Vermehrung ist möglich.
• **Hefen**: ungeschlechtlich durch Knospung oder Sprossung. Dabei wandert ein neu gebildeter Kern in einen Auswuchs der Mutterzelle und schnürt sich ab. Auch geschlechtliche Vermehrung ist möglich.
• **Bakterien**: ungeschlechtlich durch Zweiteilung (die DNA wurde zuvor verdoppelt).
• **Viren**: keine selbstständige Vermehrung möglich. Übertragung der Nucleinsäure auf eine Wirtszelle, die dann das Virus vermehrt.
9. a) Größe, Farbe, Oberflächenbeschaffenheit, Rand und Profil der Kolonien.
b) Form der Zellen: Kokken, Stäbchen, Spirillen, Vibrionen.
Beweglichkeit der Zellen (Hängetropfenpräparat).
Gramfärbung (grampositiv violett, gramnegativ rot).

10. Bildung des Mittelwerts der Koloniezahlen: $\frac{51 + 53 + 58}{3} = 54$

Berechnung des Verdünnungsfaktors: 1 : 100, 1 : 100, 1 : 10, 1 : 10, 1 : 10, also 10^7

Berechnung der KBE/mL: 54 KBE sind in 200 μL der verdünnten Kultur. Daraus errechnet sich die Anzahl der KBE in 1 mL der Ausgangskultur folgendermaßen:

$$\frac{54 \cdot 10^7}{0,2} \text{ KBE/mL} = \mathbf{2,7 \cdot 10^9 \text{ KBE/mL}}$$

11. Berechnung des Volumens der Zählkammer:

$$0,05 \cdot 0,05 \cdot 0,02 \text{ mm}^3 = 0,000050 \text{ mm}^3 = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^3 = 5 \cdot 10^{-8} \text{ mL}$$

Berechnung der Zellzahl pro Milliliter:

$$\text{in } 5 \cdot 10^{-8} \text{ mL sind 11 Zellen, in 1 mL sind } \frac{11}{5 \cdot 10^{-8}} \text{ Zellen} = 2,2 \cdot 10^8 \text{ Zellen/mL}$$

Berechnung der Zellzahl der Gesamtkultur:

$$\text{in 40 mL sind } 40 \cdot 2,2 \cdot 10^8 \text{ Zellen} = 8,8 \cdot 10^9 \text{ Zellen.}$$

Umrechnen mit Verdünnungsfaktor:

$$8,8 \cdot 10^9 \cdot 20 = 176 \cdot 10^9 \text{ Zellen, aufgerundet } \mathbf{1,8 \cdot 10^{11} \text{ Zellen}}$$

12. a) Begeißelungsformen:

- monotrich unipolar: eine Geißel an einem Zellende eines Stäbchenbakteriums;
- polytrich unipolar: viele Geißeln an einem Zellende eines Stäbchenbakteriums;
- polytrich bipolar: viele Geißeln an beiden Zellenden eines Stäbchenbakteriums;
- peritrich: viele Geißeln über die gesamte Zelloberfläche verteilt.

b) Nachweis durch den „Hängenden Tropfen“: Ein Tropfen der Bakteriensuspension hängt an einem Deckglas über einem Objektträger mit einer Vertiefung. Beim Betrachten mit dem Mikroskop erkennt man, dass begeißelte Bakterien schwimmen.

c) Zielgerichtete Bewegung auf einen Reiz zu.

13.

	Bunte Reihe	O/F-Test	Katalase-/Oxidase-Test
Stoffwechseleigenschaft	Fähigkeit bestimmte Stoffe, vor allem Zucker, abzubauen.	Fähigkeit, Atmung (O) oder Gärung = Fermentation (F) zu betreiben und dabei Säure zu bilden.	Fähigkeit, mit Hilfe der Enzyme Katalase bzw. (Cytochrom)-Oxidase H_2O_2 zu entgiften.
Nachweisreagenz	Säure-Base-Indikator.	Säure-Base-Indikator.	H_2O_2
Beobachtung	Farbumschlag des Indikators.	Farbumschlag des Indikators oxidativer Abbau: Wachstum an der Oberfläche des Röhrchens ohne Paraffin, fermentativer Abbau: Wachstum im Röhrchen mit Paraffin.	Katalase: Aufschäumen durch O_2 . Oxidase: Rotfärbung durch Oxidation des Farbstoffs.

14. a) Agardiffusionstest: Auf einer dicht mit dem Testkeim bewachsenen Agarplatte bilden sich um Blättchen mit dem Antibiotikum Hemmhöfe aus.

b) Reihenverdünnungstest: In Kulturröhrchen mit dem Testkeim und verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums kommt es nur dann zur Trübung, wenn das Antibiotikum den Keim nicht hemmt.

3 Durchführung biotechnologischer Arbeiten

	Chemisches Verfahren	Biotechnisches Verfahren
Ausgangsstoffe:	Ethen erdölabhängig	Kohlenhydrate nachwachsende Rohstoffe
Energie:	hohe Temperatur	Raumtemperatur
Anlage:	Druckbehälter	Gärtank

2. Die Zeit t ist mit der Generationszeit g über die Anzahl der Zellteilungen n verknüpft gemäß Gleichung 4:

$$g = \frac{t}{n} \quad t = n \cdot g$$

Die Anzahl der Zellteilungen kann nach folgender Formel aus der Zellzahl zu Beginn N_0 und am Ende der Teilungen N gemäß Gleichung 2 errechnet werden:

$$n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2}$$

$$n = \frac{\lg 10^8 - \lg 3,5 \cdot 10^4}{\lg 2} = \frac{8 - (0,544 + 4)}{0,301} = \frac{3,456}{0,301} = 11,48$$

$$t = 11,48 \cdot 40 \text{ min} = 459 \text{ min} = \mathbf{7 \text{ h } 39 \text{ min}}$$

3. Die Wachstumsrate μ ist mit der Zellmasse X und der Zeit t über Gleichung 5 verknüpft:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Durch Umformen ergibt sich:

$$\frac{X}{X_0} = e^{\mu \cdot t}$$

Logarithmieren zur Basis e und Auflösen nach μ ergibt:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu \cdot t \quad \ln X - \ln X_0 = \mu \cdot t \quad \mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t}$$

$$\mu = \frac{\ln 20000 - \ln 300}{24 \text{ h}} = \frac{9,903 - 5,704}{24 \text{ h}} = \mathbf{0,176/\text{h}}$$

Setzt man in der obigen Gleichung für t die Verdopplungszeit t_d und für die Zellmasse X die doppelte Anfangszellmasse $2X_0$ ein, so erhält man:

$$2 \cdot X_0 = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t_d}$$

Der Ausdruck vereinfacht sich dadurch zu $2 = e^{\mu \cdot t_d}$

Nach dem Logarithmieren zu Basis e ergibt sich

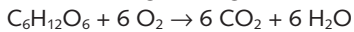
$$\ln 2 = \mu \cdot t_d \quad \text{und damit} \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad t_d = \frac{0,693}{0,176} \quad \mathbf{t_d = 3,9 \text{ Stunden}}$$

4. 80 % entsprechen 0,8

$$Y = \frac{80 \text{ g}}{100 \text{ g Glucose}} = \mathbf{0,8}$$

$$Y = \frac{\text{Produktmenge}}{\text{Substratmenge}} = \frac{P}{S}$$

5. Die Reaktionsgleichung für die aerobe Atmung lautet wie folgt:



aus 1 mol Glucose entsteht 6 mol CO_2 .

Berechnung der Stoffmenge an CO_2 aus dem Volumen:

$$n(\text{CO}_2) = \frac{V(\text{CO}_2)}{V_{m,n}(\text{CO}_2)} = \frac{650 \text{ L} \cdot \text{mol}}{22,4 \text{ L}} = 29,02 \text{ mol}$$

Berechnung der Stoffmenge an Glucose aus der Stoffmenge an CO_2 :

$$n(\text{Glucose}) = 1/6 n(\text{CO}_2) = \frac{29,02}{6} = 4,84 \text{ mol}$$

Berechnung der Masse der verbrauchten Glucose:

$$m = M \cdot n \quad M(\text{Glucose}) = 180 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$m(\text{Glucose}) = 180 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot 4,84 \text{ mol} = 870,53 \text{ g}$$

Berechnung der restlichen Glucose:

$$1000 \text{ g} - 870,53 \text{ g} = \mathbf{129,47 \text{ g}}$$

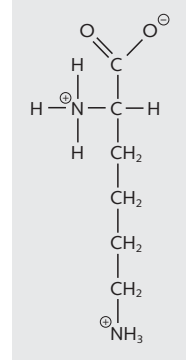
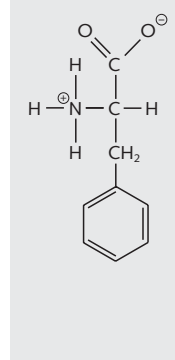
6. • Abtrennung der Zellmasse, z. B. durch Filtration,
 • schonender Zellaufschluss, z. B. mechanisch,
 • Isolierung des Proteins, z. B. durch Ausfällung des Proteins mit einem Neutralsalz,
 • Konzentrierung, z. B. durch Dialyse,
 • Reinigung, z. B. durch Gelfiltration (Chromatographie).
7. a) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_7\text{-COOH} + 2 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2$
 b) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{-CHOH-COOH} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{CO}_2$
8. a) Emers: Essigsäure, Citronensäure, Glutaminsäure
 Submers: Ethanol
 b) Primärmetabolite: Ethanol, Milchsäure, Essigsäure
 Sekundärmetabolite: Antibiotika

4

Durchführung biochemischer Arbeiten

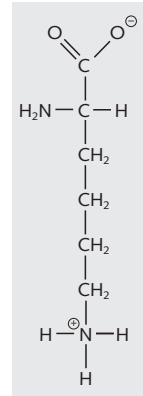
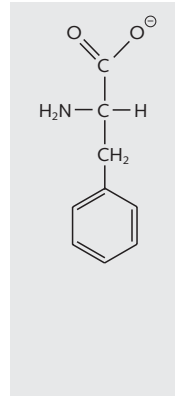
1. pH 5,88

Bei pH 5,88 liegt das Phenylalanin als Zwitterion vor und wandert nicht, das Lysin dagegen als Kation und wandert.



pH 9,9

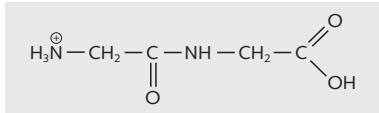
Bei pH 9,9 liegt das Lysin als Zwitterion vor und wandert nicht, das Phenylalanin dagegen als Anion und wandert.



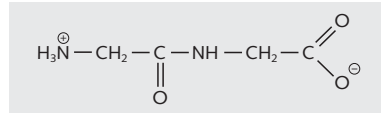
2. a) Puffersäure

b) korrespondierende Base

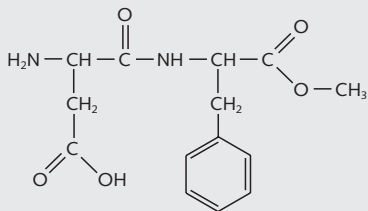
a)



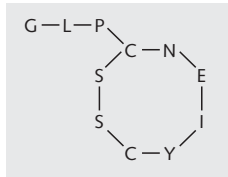
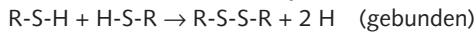
b)



3.



4. Disulfidbrücke zwischen 2 Cysteinresten:



Tertiärstruktur

5. a) $\frac{13\,640 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{110 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} = 124$; 124 Aminosäuren
 b) $2332 \cdot 110 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 256\,520 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, entsprechend etwa 260 kDa
6. • Aussalzen, fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfatlösungen unterschiedlicher Konzentration.
 • Aus der verdünnten Lösung fällt das Fibrinogen aus, aus der konzentrierten das Albumin.
 • Durch Dialyse wird das jeweilige Protein vom Salz befreit.
7. Bei der Gelfiltration dringen kleine Moleküle in die Kügelchen der Trägersubstanz ein, große nicht und werden deshalb schneller eluiert.
 Bei der SDS-PAGE wandern kleine Moleküle schneller durch das Gel.
8. a) Ninhydrin: Nachweis von Aminosäuren bei der DC
 b) β -Mercaptoethanol: Denaturierung von Proteinen für die SDS-PAGE
 c) Kupfer(II)sulfat: in der Proteinanalytik: Biuretreaktion, Lowry-Methode, BCA-Methode
 d) SDS: Denaturierung von Proteinen für die SDS-PAGE. Erzeugung einer negativen Ladung aller Proteinmoleküle
 e) Coomassie-Brilliant-Blau: Anfärben von Proteinen bei der Elektrophorese, Bradford-Methode
9. • Die **Ausfällung** ist in der Regel ein reversibler Vorgang, bei dem ein Protein von seinen Begleitstoffen getrennt wird. Seine biologische Funktion bleibt dabei erhalten.
 • Bei der **Denaturierung** erfolgt häufig auch eine Zusammenballung, die aber irreversibel verläuft. Weil Quartär- und Tertiärstruktur zerstört werden, geht die biologische Funktion verloren.
10. a) Ladung, Größe und Form bestimmen die Wanderungsgeschwindigkeit.
 b) • Bei der SDS-PAGE wird der Einfluss der Ladung ausgeschaltet, indem durch das SDS alle Proteine einheitlich negativ geladen sind. Die Auftrennung erfolgt nach der Molmasse.
 • Bei der IEF erfolgt die Auftrennung von Proteinen mit ähnlicher Molekülgröße auf Grund der Ladung in Zonen mit verschiedenen pH-Werten innerhalb des Gels, weil am isoelektrischen Punkt keine Wanderung erfolgt.

5 Durchführung immunologischer und diagnostischer Arbeiten – Enzyme

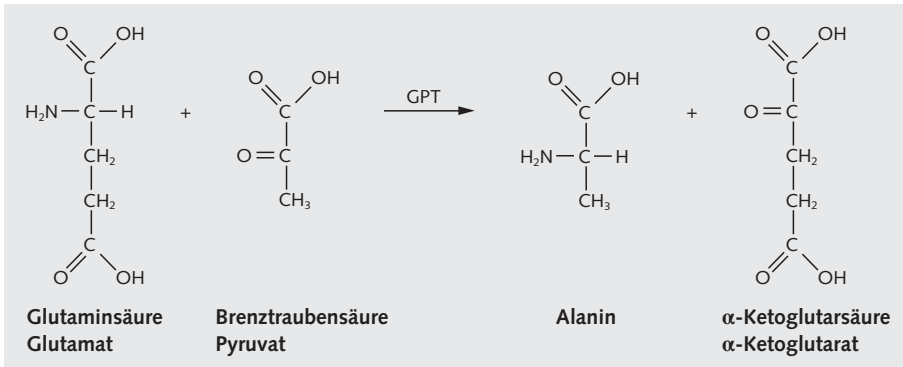
1. Wirkungsspezifität: Beide Enzyme gehören zur Klasse 3, den Hydrolasen.

Diese können nur die hydrolytische Spaltung katalysieren und keine andere Reaktion.

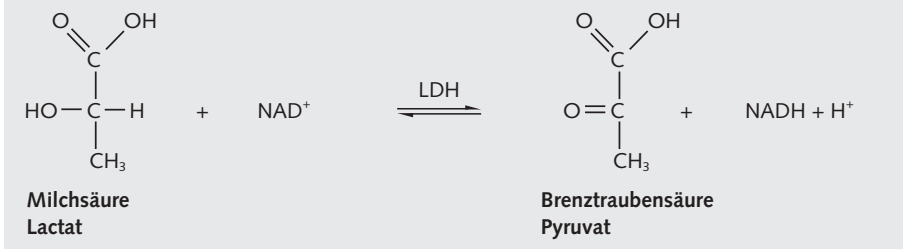
Substratspezifität:

- α -Glucosidase kann nur die α -1,4-glykosidische Bindung im Maltosemolekül spalten, wobei 2 mol D-Glucose entstehen.
- β -Galactosidase kann nur die β -1,4-glykosidische Bindung im Lactosemolekül spalten, wobei 1 mol β -D-Galactose und 1 mol D-Glucose entstehen.

2. Die Reaktion ist eine Transaminierung, das Enzym also eine Transaminase und gehört in die Klasse 2 der Transferasen.



3.



Je kleiner der K_M -Wert, desto größer ist die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat, d. h. Brenztraubensäure wird schneller umgesetzt als Milchsäure und das Gleichgewicht liegt links.

4. Für das Lineweaver-Burk-Diagramm müssen die reziproken Werte von $c(S)$ und v berechnet werden.

		ohne Inhibitor		mit Inhibitor	
$c(S)$ in in $\frac{\text{mmol}}{\text{L}}$	$\frac{1}{c(S)}$ in $\frac{\text{L}}{\text{mmol}}$	v in $\frac{\text{mmol}}{\text{min}} \cdot 10^{-3}$	$\frac{1}{v}$ in $\frac{\text{min}}{\text{mmol}} \cdot 10^3$	v in $\frac{\text{mmol}}{\text{min}} \cdot 10^{-3}$	$\frac{1}{v}$ in $\frac{\text{min}}{\text{mmol}} \cdot 10^3$
2	0,500	0,187	5,35	0,150	6,67
4	0,250	0,263	3,80	0,227	4,41
6	0,167	0,308	3,25	0,274	3,65
8	0,125	0,330	3,03	0,303	3,30
10	0,100	0,351	2,85	0,323	3,10

a) $\frac{1}{v_{\max}} = 2200 \frac{\text{min}}{\text{mmol}}$ $v_{\max} = 0,455 \cdot 10^{-3} \frac{\text{min}}{\text{mmol}}$

ungehemmte Reaktion ohne Inhibitor

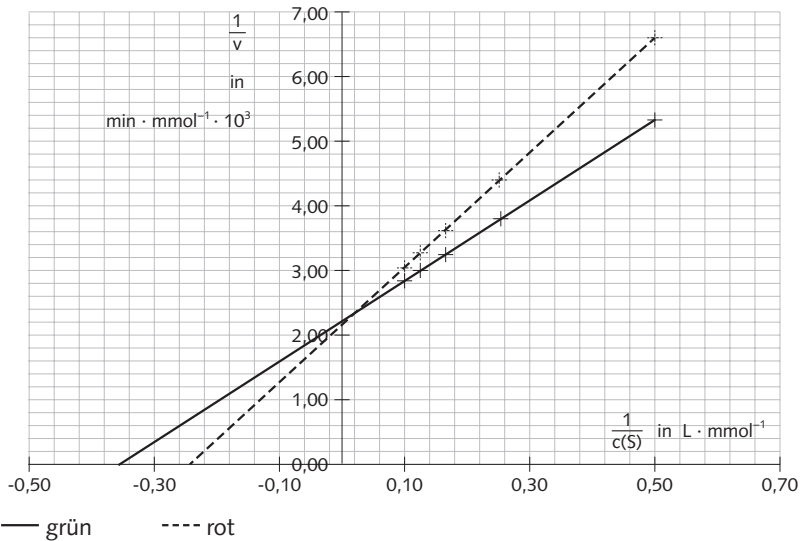
$-\frac{1}{K_M} = -0,35 \frac{\text{L}}{\text{mmol}}$ $K_M = 2,79 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

gehemmte Reaktion mit Inhibitor

$-\frac{1}{K_M} = -0,245 \frac{\text{L}}{\text{mmol}}$ $K_M = 4,12 \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$

b) Da v_{\max} konstant bleibt und K_M größer wird, handelt es sich um eine kompetitive Hemmung

Lineweaver-Burk-Diagramm



5. Lambert-Beersches Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

$$c = \frac{0,042}{1,85 \cdot 10^4 \cdot 1} \frac{\text{mol} \cdot \text{cm}}{\text{L} \cdot \text{cm}}$$

$$c = \frac{0,0227 \text{ mol}}{10^4 \text{ L}}$$

$$c = \frac{2,27 \text{ mol}}{10^6 \text{ L}}$$

$$c = \frac{2,27 \text{ mmol}}{10^3 \text{ L}}$$

$$c = 2,27 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}$$

Die Enzymaktivität wird in U, d. h. $\mu\text{mol}/\text{min}$ angegeben.

In diesem Fall werden $2,27 \mu\text{mol}$ pro $10 \mu\text{L}$ Probe umgesetzt.

Das Ergebnis muss noch mit dem Gesamtvolumen in der Küvette ($1000 \mu\text{L}$) und dem eingesetzten Probevolumen ($10 \mu\text{L}$) korrigiert werden.

Zur Berechnung muss das Konzentrationsergebnis also noch mit dem Faktor $\frac{1010}{10}$ multipliziert werden.

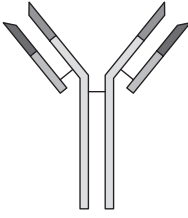
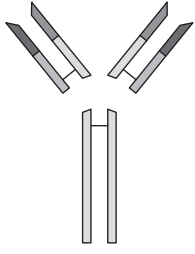
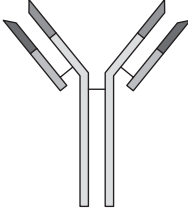
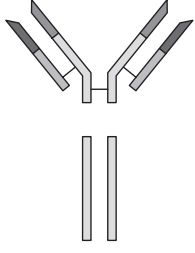
Die Aktivität beträgt: $2,27 \cdot \frac{1010}{10} \mu\text{mol}/\text{L} = 229 \text{ U}/\text{L}$.

Umrechnung der Einheiten:

Um von $229 \text{ U}/\text{L}$ (U in $\mu\text{mol}/\text{min}$) auf die Angabe in $\mu\text{kat}/\text{L}$ (μkat in $\mu\text{mol}/\text{s}$) zu kommen, muss man durch 60 dividieren und erhält damit die Aktivität $3,82 \mu\text{kat}/\text{L}$.

6 Durchführung immunologischer und diagnostischer Arbeiten – Immunglobuline

1.	polyklonale Antikörper	monoklonale Antikörper
Herkunft	verschiedene B-Lymphocyten, daher liegen im Antiserum verschiedene Antikörper gegen ein Antigen vor	ein Zellklon von Hybridoma-Zellen, fusioniert aus einem B-Lymphocyten und einer Myelomzelle (Krebszelle)
Wirkungsweise	Antiserum gegen mehrere Epitope eines Antigens gerichtet, jeder Antikörper gegen ein anderes	gegen ein einziges Epitop eines Antigens gerichtet

2.		Spaltung durch Papain:		3 Fragmente: 2 Fragmente mit je einer Antigen-bindungsstelle, 1 Fragment ohne Antigen-Bindungsstelle
		Spaltung durch Pepsin:		2 Fragmente: 1 Fragment mit 2 Antigen-bindungsstellen, im Prinzip ein verkleinerter Antikörper, 2 Fragmente ohne Antigen-bindungsstellen.

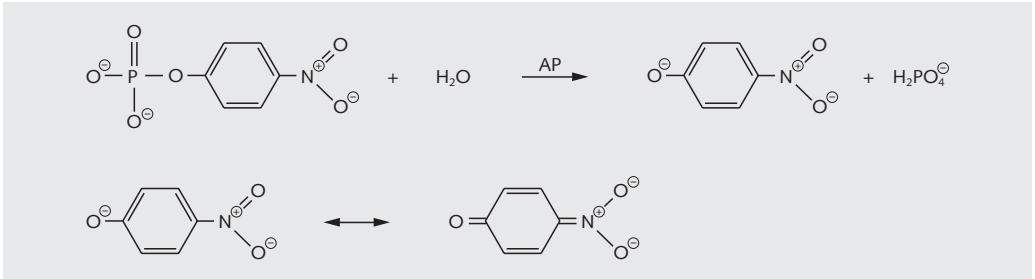
3.	Enzym	Antikörper
Spezifischer Reaktionspartner	Substrat	Antigen
Komplex	Enzym-Substrat-Komplex	Antigen-Antikörper-Komplex
Bindungsstelle des spezifischen Reaktionspartners	aktives Zentrum	Antigen-Bindungsstelle = Paratop
weitere Bindungsstellen	außerhalb des aktiven Zentrums	weitere Bindungsstellen für andere Proteine wie Antikörper

4. a) Enzymklasse: Hydrolase (Ziffer 3)

katalysierte Reaktion: hydrolytische Spaltung einer Esterbindung (Ziffern 3.1)

hydrolytische Spaltung einer Phosphodiesterbindung (Ziffer 3.1.3)

- b) Bei der hydrolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindung durch die alkalische Phosphatase (AP) entsteht das p-Nitrophenolation. Dieses bildet ein chinoides System aus, das sich leichter durch Licht anregen lässt.

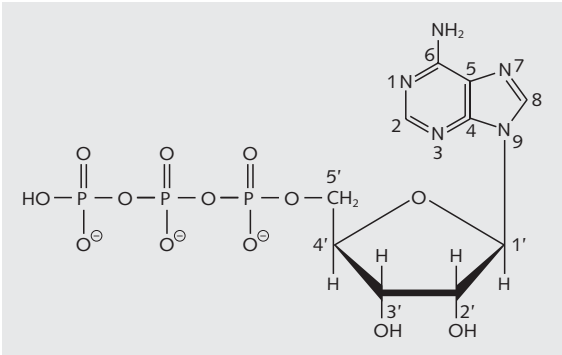


5. Reihenfolge der Schritte:

1. Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Antikörpern gegen das Aflatoxin
2. Entfernen überschüssiger AK durch Waschen mit Pufferlösung
3. Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen durch BSA (Rinderserumalbumin)
4. Entfernen des überschüssigen BSA durch Waschen mit Pufferlösung
5. Zugabe von Aflatoxin, das mit einem Enzym markiert wurde, z. B. Peroxidase
6. Zugabe der Probe mit Aflatoxin
7. Das an den Antikörper auf der Platte gebundene enzymmarkierte Aflatoxin konkurriert mit dem unmarkierten Aflatoxin der Probe um die Bindungsstellen am Antikörper. Bei hoher Konzentration in der Probe wird das markierte Aflatoxin verdrängt.
8. Inkubation: Bildung des AK-AG-Komplexes.
9. Entfernen des überschüssigen Aflatoxins durch Waschen mit Pufferlösung
10. Zugabe eines zweiten Antikörpers, der gegen den Aflatoxin-Antikörper gerichtet ist
11. Erneutes Waschen mit Pufferlösung
12. Zugabe der Substratlösung, z. B. TMB/H₂O₂
13. Umsetzung des Substrates zu einer farbigen Verbindung durch das Enzym
14. Je mehr enzymmarkierter Antikörper gebunden wurde, desto intensiver die Färbung, je mehr Aflatoxin in der Probe, desto schwächer die Färbung.

7 Durchführung molekularbiologischer Arbeiten

1. Es entsteht die Strukturformel von ATP.



2. a) entfernt Bestandteile der Zellmembran, nämlich Lipide
- b) fällt Proteine aus
- c) entfernt RNA
- d) fällt DNA aus (Anreicherung aus verdünnten Lösungen)

3. a) $E = 1,0 \cong 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{DNA} \Rightarrow E = 0,550 \cong 27,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{DNA}$

Umrechnen auf die ursprüngliche Probe: $\cdot \frac{1000}{20}$

DNA: 1375 μg

b) Umrechnen der DNA-Menge von 1 mL (1000 μL) auf 50 μL Plasmidpräparation

$$1375 \cdot \frac{50}{1000} \mu\text{g} = 68,75 \mu\text{g}$$

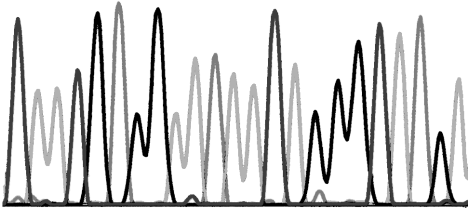
c) $\frac{E_{260}}{E_{280}} = \frac{0,550}{0,305} = 1,803$ Die DNA ist rein genug.

4. a) Beim Schmelzen der DNA werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aufgebrochen. Zwischen Guanin und Cytosin werden drei Wasserstoffbrücken ausgebildet, zwischen Adenin und Thymin dagegen nur zwei, die getrennt werden müssen.
- b) Der obere Strang wird vervielfältigt, weil sich der Primer so anlagert, dass eine OH-Gruppe an seinem 3'-Ende zur Anlagerung weiterer Nucleotide zur Verfügung steht. Der neue Strang wächst in 5'-3'-Richtung von rechts nach links.



5. neuer Strang: 5'-**TCCTG** **AGGCC** **ACCTC** **GGGTC** **AGC**-3'
 ursprünglicher Strang: 3'-**AGGAC** **TCCGG** **TGGAG** **CCCAG** **TCG**-5'
 bzw. 5'-**GCTGA** **CCCGA** **GGTGG** **CCTCA** **GGA**-3'
 blau ■■■, grün ■■■, rot ■■■

TCCTGAGGCCACCTCGGGTCAGC



6. a) Übertragung von Nucleotiden bei der Synthese des komplementären Einzelstranges (Transferase)
- b) Verursachen von Doppelstrangbrüchen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen (Hydrolase)
- c) Verknüpfung der Nucleotide durch Bildung neuer Phosphodiesterbindungen (Ligase)
- d) Übertragung von Nucleotiden bei der Synthese eines zu RNA komplementären DNA-Stranges (Transferase)

7. a) *PvuII*: 5'CAG↓CTG3' grün ■■■, *SmaI*: 5'CC↓GGG3' rot ■■■

5' TTCCGAATTG ATG**CCCGGT** AAACACTAT GTGTTGTGCA CTAATGTTT**C** **AGCTG**AAAACC TGGCCATAGG CTA**CTATTAG**
 3' AAGGCTTAAC TAC**GGGCCA** TTTGATGATA CACAACACGT GATTACAA**AG** **TCGAC**TTTGG ACCGGTATCC GATGATAATC

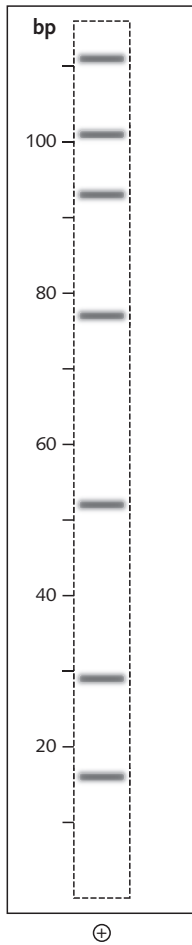
TATTATCTCT GGGAAACGAG CTCTCGG**CCC** **GGG**GATTAAT GTCAAAGTCT GAAATTCCCA ATCATCATCC TGGGAGGGTG
 ATAATAGAGA CCCTTGCTC GAGAGCC**GGG** **CCC**CTAATTA CAGTTTCAGA CTTTAAGGGT TAGTAGTAGG ACCCTCCAC

CAGCTGAGAG AAGGCCATGA CCACACTCTA TGTGAAAAGT GAGCAGCA**CC** **CGGGT**CTTTC ATATGGGC AGAGCCCTTTA 5'
GTCGACTCTC TTCCGGTACT GGTGTGAGAT ACACTTTTCA CTCGTCGT**GC** **GCCCAG**AAAG TATACCCGG TCTCGGGAAT 3'

b) *PvuII*: 2 Erkennungsstellen, 3 Fragmente: 52 bp, 111 bp, 77 bp

SmaI: 3 Erkennungsstellen, 4 Fragmente: 16 bp, 94 bp, 101 bp, 29 bp

c) ⊖



8. Spender-DNA und Plasmid-DNA werden mit demselben Restriktionsenzym geschnitten.
Spender-DNA und Plasmid-DNA werden gemischt.
Durch das Enzym Ligase werden die Restriktionsfragmente verknüpft.
Die Plasmide werden auf – vorher kompetent gemachte – Bakterienzellen übertragen.

8

Durchführung zellkulturtechnischer Arbeiten

	Tierisches Gewebe	Pflanzliches Gewebe
Zellbegrenzung	Zellmembran	Zellmembran + Zellwand
Verbindung zum Gewebe	Extrazelluläre Matrix aus Polysacchariden und Proteinen, Verknüpfungen durch Proteine (tight junctions, Desmosomen, gap junctions)	Mittellamelle aus Pektin
Stoffaustausch	Tunnelkontakte, Proteine der Zellmembran	Plasmodesmen, die durch die Tüpfel der Zellwände führen

- Adulte Stammzellen: Tierische Gewebe, z. B. Haut und Schleimhaut. Sie erzeugen neue Zellen desselben Gewebes.
 - Embryonale Stammzellen: Tierisches Gewebe von Embryos. Sie können jede Zelle des betreffenden Organismus hervorbringen.
 - Kalluszellen: Pflanzliches Gewebe nach Verletzung. Sie können eine vollständige neue Pflanze hervorbringen.
- Die PBS-Lösung entfernt Spuren von Medium, dessen Proteine die Wirkung des proteolytischen Enzyms Trypsin beeinträchtigen. Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen würden EDTA binden und dem Prozess entziehen. Der Puffer hält den pH-Wert stabil.
 - Trypsin hydrolysiert die Proteine der extrazellulären Matrix, EDTA bindet die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen der Zellverbindungen. Dadurch werden die Zellen von der Unterlage abgelöst und vereinzelt.
 - Enthält besonders viele Proteine. Dadurch wird überschüssiges Trypsin daran gehindert, Zellproteine zu zerstören.

4. Zellsuspension: $\frac{x \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = \frac{2 \cdot 10^5 \text{ Zellen}}{7,5 \cdot 10^5 \text{ Zellen}}$ $x \text{ mL} = 0,27 \text{ mL}$
 Medium: $5 \text{ mL} - 0,27 \text{ mL} = 4,73 \text{ mL}$

5. geforderte Gesamtzellzahl: $5 \cdot 10^4 \text{ Zellen} \cdot 96 = 4,8 \cdot 10^6 \text{ Zellen}$
 gefordertes Gesamtvolumen: $0,2 \text{ mL} \cdot 96 = 19,2 \text{ mL}$

Berechnung des Volumens der Zellsuspension, das $4,8 \cdot 10^6$ Zellen enthält:

$$\frac{x \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = \frac{4,8 \cdot 10^6 \text{ Zellen}}{1,95 \cdot 10^6 \text{ Zellen}}, \quad x \text{ mL} = 2,46 \text{ mL}$$

Berechnung des zuzusetzenden Mediums:

$$19,2 \text{ mL} - 2,46 \text{ mL} = 16,74 \text{ mL}$$