

Übung 5:

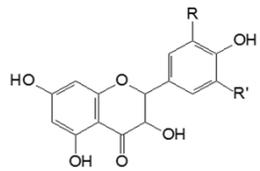
Substratspezifität von rekombinanten Dihydroflavonol 4-reduktasen

Teil A und B

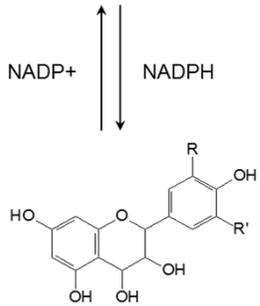
Inhalt

- Dihydroflavonol 4-reduktasen
- heterologe Expression
- Enzymatische Zell Lyse
- Protein Reinigung
- Enzymaktivitätstests
- Radioaktivität
- Durchführung Western Blot
- Abgabe der Ergebnisse/Bewertung

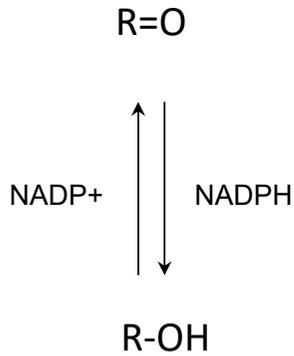
Dihydroflavonol 4-reduktase (DFR): Oxidoreduktase



Dihydroflavonol

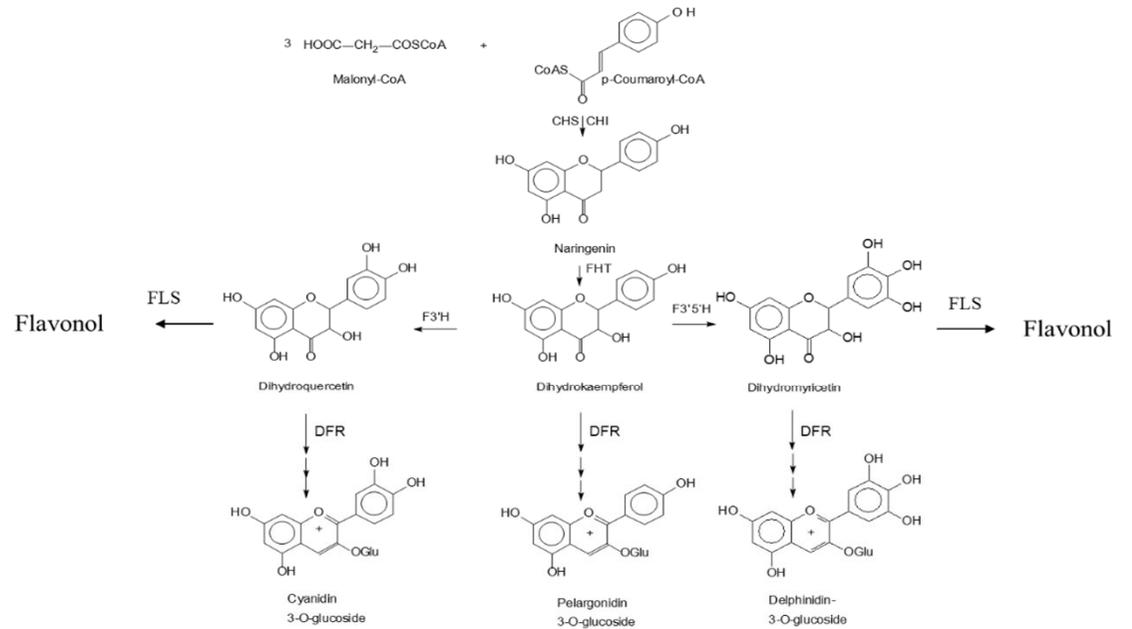
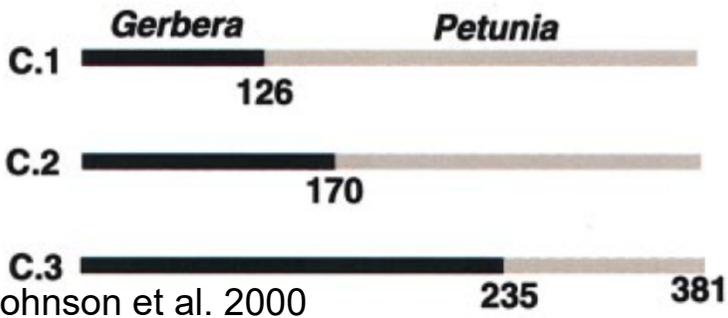


Leucoanthocyanidin



121

Ger: VKKLVFTSSAGTVNGQEKQLHVYDESHWSDLD**FI**YSKKMTL
 Rosa: VRRLVFTSSAGSVNVEETQKPVYNESNWS**DVEFC**RRRVKMTL
 Antir: VKKFIFTTSGGTVNVEEHQKPVYDETDSS**DMDF**INSKMTL
 Dian: VRRVFTSSGGTVNVEATQKPVYDETCWS**DLDF**IRSVKMTL
 Zea: VRRIVFTSSAGTVNLEERQRPVYDEESW**TDVDF**CRRVKMTL
 Pet: VKRLVFTSSAGTLDVQEQQKLFYDQTSW**DLDF**IYAKKMTL



BabyDoll Corso Rot Electric Orange Viva Orange Corso Blau Corso Himmelblau

Cyanidin-type native petunias Pelargonidin-type GE-petunias Delphinidin-type native petunias

Heterologe Expression als GST-Fusionsprotein in *E.coli*

- 1 Petrischale mit 2 Kolonien aus der Liste von Klonen (1 Wildtyp, 1 Mutante)
- Beimpfen von der Petrischale (mit Gruppennummer beschriftet)
- Übernachtskulturen in Epruvetten anziehen
- 100ml Expressionsmedium in 250 ml Kolben mit 2.5 ml Übernachtskultur beimpfen
- Bei 37°C und 200 rpm inkubieren bis eine OD600 von ca. 0,6 - 0,7 erreicht wird (Medium als Reagenzienleerwert, dauert i.d.R. 2-4 h; ca. nach 2 h das erste Mal zu messen beginnen), nach maximal 4 h, induzieren (OD notieren)
- 10 min bei RT abkühlen
- 100 µL IPTG-Lösung (1 mM Endkonzentration) hinzufügen
- Nach 3 h bei 28 °C und 160 rpm finale Zelldichte bestimmen, 1 OD entspricht etwa 2×10^9 Zellen pro ml Kultur und weist am Photometer eine Extinktion von 1.0 auf
- Volumen berechnen in dem 12 OD enthalten sind
- Volumina in 2 ml Reaktionsgefäße pelletieren (jeweils 2 Replikate)
- Pellets bei -80°C lagern

Zellyse

Lysemethoden von Bakterienzellen:

- Ultraschall
- Homogenisierung (French press)
- Einfrier-/Auftauzyklen
- **Enzymatisch mit Hilfe von Lysozym**

Enzymatische Zellyse

- Schonendste Methode, im großen Maßstab allerdings teuer
- Lysozym verdaut die Peptidoglycan Schicht der Bakterienzellen
- Gramnegative Bakterien besitzen eine externe Zellwand die zunächst permeabilisiert werden muss → Tris permeabilisiert effektiv; EDTA komplexiert Mg^{2+} -Ionen, welche die Zellmembranen stabilisieren
- Durch die Lyse wird viel DNA freigesetzt → hohe Viskosität → daher Verdau mit DNase

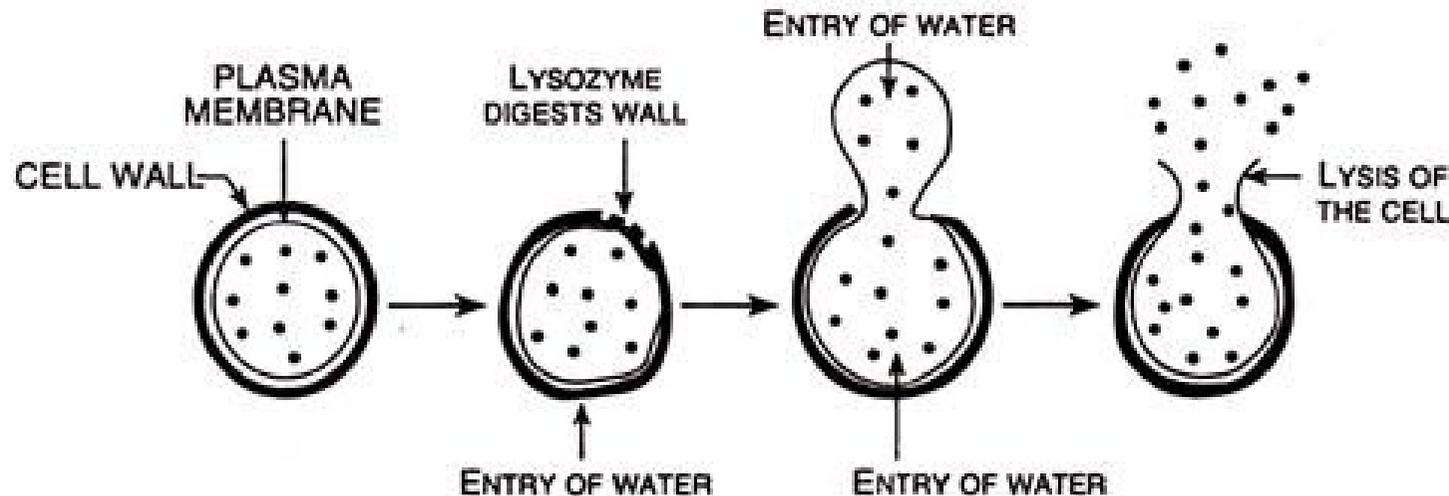


FIG. 44.18. Lysis of a bacterial cell due to wall digestion by lysozyme.

Zellyse

Die beiden Zellpellets aufschliessen (Wildtyp, Mutante)

Tiefgefrorene Zellpellets auf Eis mit 450 μl Lysispuffer und 50 μl Lysozymlösung resuspendieren

45 min auf Eis inkubieren und alle 15 min resuspendieren

5 μl MgCl_2 -Lösung zugeben und resuspendieren

10 μl DNase-Lösung zugeben, resuspendieren und ca. 20 min. auf Eis inkubieren

Zentrifugieren (14000 $\times g$, 4 °C, 10 min.) und Überstand weiterverwenden

Protein Reinigung

Prinzipien:

- Ionenaustauschchromatographie
- Hydrophobe Interaktionschromatographie
- **Affinitätschromatographie**
- **Größenausschlusschromatographie**
- Reversed Phase Chromatographie

Affinitätschromatographie

Components of an affinity chromatography medium



Matrix: for ligand attachment. Matrix should be chemically and physically inert.



Spacer arm: used to improve binding between ligand and target molecule by overcoming any effects of steric hindrance.



Ligand: molecule that binds reversibly to a specific target molecule or group of target molecules.

Affinitätschromatographie

Ablauf:



1. Äquilibrierung



2. Probenapplikation und Waschschrift



3. Elution



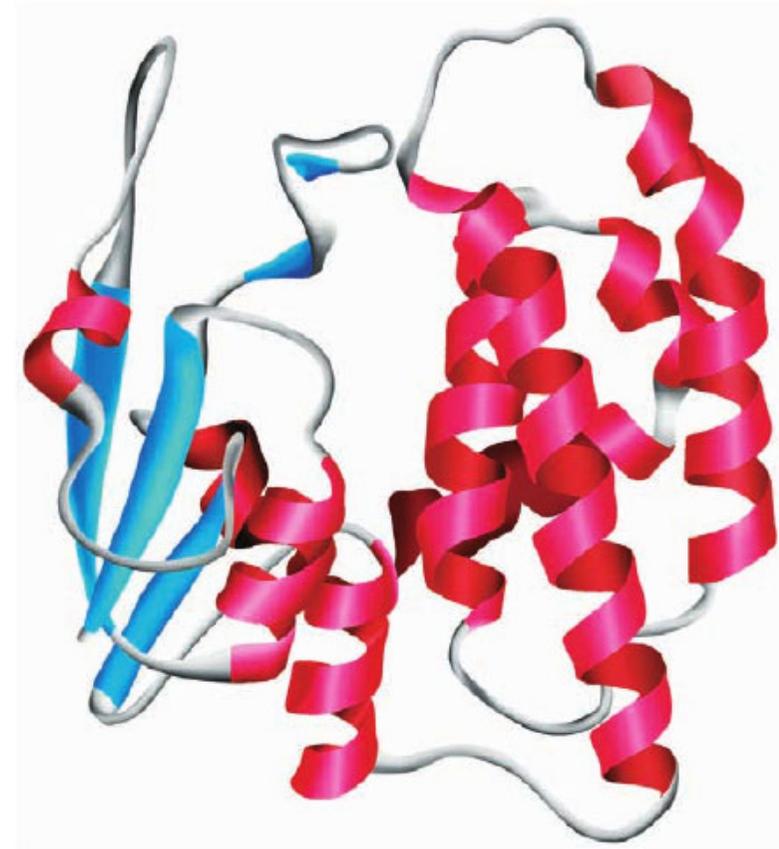
4. Reäquilibrierung

Affinitätschromatographie

GST-Fusions System:

- Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und Zielprotein
- Ggf. erhöhte Löslichkeit, unterstützt die korrekte Faltung des Zielproteins
- GST bindet an Linker, an dem Glutathion kovalent gebunden ist
- Elution durch steigende Glutathionkonzentration im Elutionspuffer

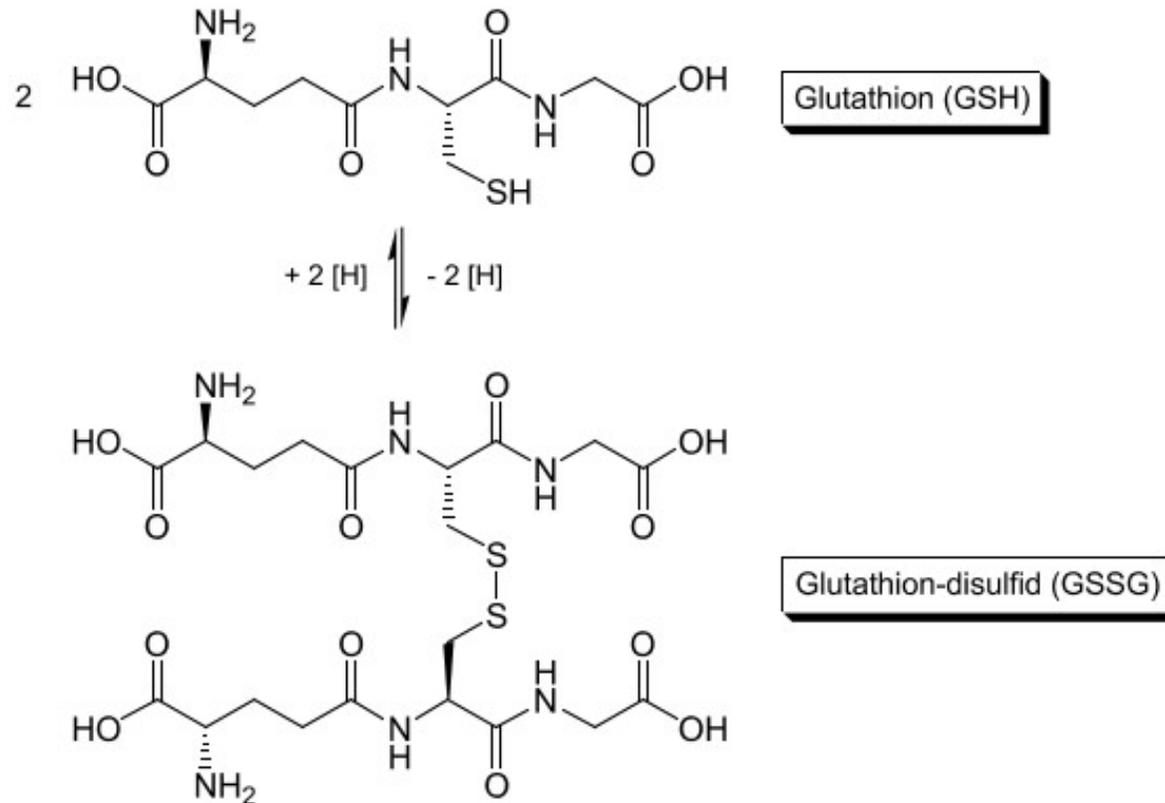
Glutathion-S-Transferase



Affinitätschromatographie

Glutathion (GSH):

- Tripeptid (Glu-Cys-Gly)
- Wichtiges Antioxidant im Körper
- Autooxidation, häufig Zusatz von DTT in Elutionspuffer bzw. rascher Pufferaustausch um Oxidation und Aggregation mit Fusionsprotein zu verhindern
- GSH, GSSG und DTT: Einfluss auf Disulfidbrücken der Zielproteine; können einen Einfluss auf die Aktivität von Oxidoreduktasen haben (pH-Abhängiges Redoxpotential)



Affinitätschromatographie

GST-Sepharose Beads equilibrieren: mit Aufschlusspuffer durch Invertieren resuspendieren, anschließend 5 min bei 500 x g zentrifugieren und den Überstand verwerfen; Schritte 4 x wiederholen

Überstand auf die GST-Sepharose Beads geben und durch Invertieren resuspendieren

Reaktionsgefäße in ein mit Eis gefülltes Falcontube geben und im Überkopfschüttler 30 min. inkubieren

Zentrifugieren (500 x g, 5 min, 4 °C) und den Überstand verwerfen

GST-Sepharose Beads waschen: mit Aufschlusspuffer durch Invertieren resuspendieren, anschließend 5 min bei 500 x g zentrifugieren und den Überstand verwerfen; Schritte 3 x wiederholen

Elution: zu den GST-Sepharose Beads 80 µl Elutionspuffer geben und durch Invertieren resuspendieren; Reaktionsgefäße in ein mit Eis gefülltes Falcontube geben und im Überkopfschüttler 10 min. inkubieren

Zentrifugieren (500 x g, 4 °C, 5 min.) und Überstand in ein Protein LoBind Tube überführen

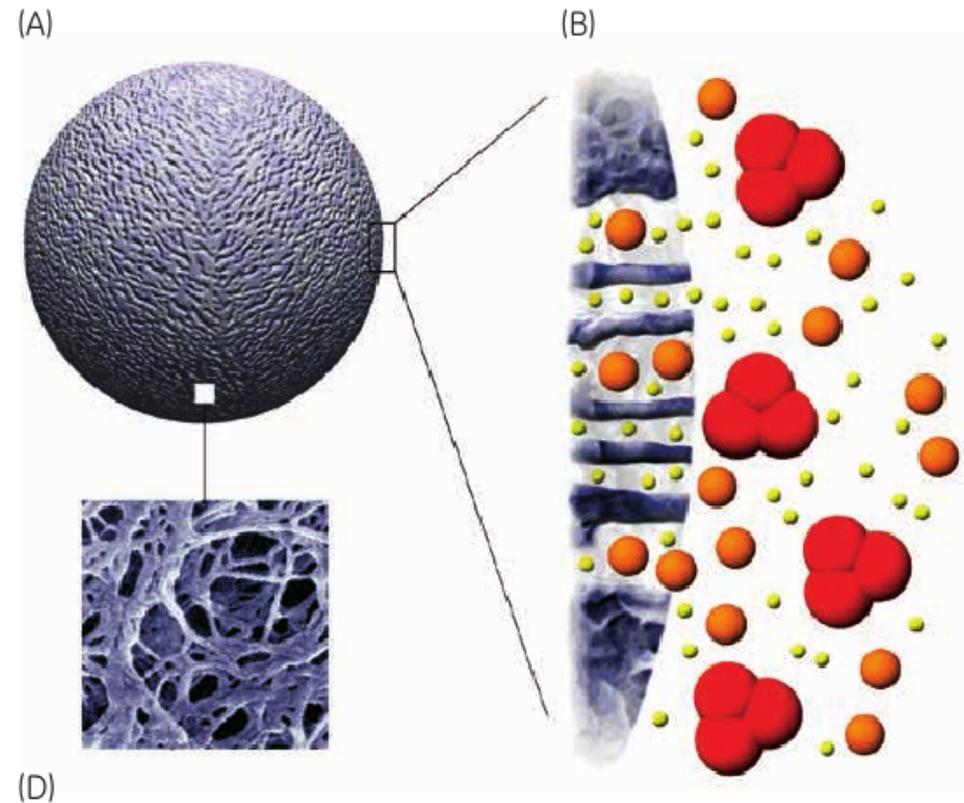
Elutionsschritte 2 mal wiederholen und die Überstände in das jeweilige Protein LoBind Tube überführen

GST-Sepharose Beads mit Aufschlusspuffer äquilibrieren (4 x, siehe oben) und zurückgeben

Größenausschlusschromatographie

Prinzip:

- Poröses Chromatographiegel
- Kleine Moleküle dringen in die Beads ein und haben einen längeren Weg durch die Säule
- Große Moleküle eluieren zuerst
- In der Regel eluieren alle Moleküle innerhalb eines Säulenvolumens (column volume C_V)
- Ermöglicht je nach Säulenmaterial Trennung von Biomolekülen bzw. Gruppenseparierung (entsalzen, Pufferaustausch)



Größenausschlusschromatographie

Gruppenseparierung:

- Probenvolumen ist abhängig vom Säulenmaterial
- Sephadex G-25 medium: Probenvolumen bis zu 30 % des Säulenvolumens möglich

Umpufferung mittels

Größenausschlusschromatographie

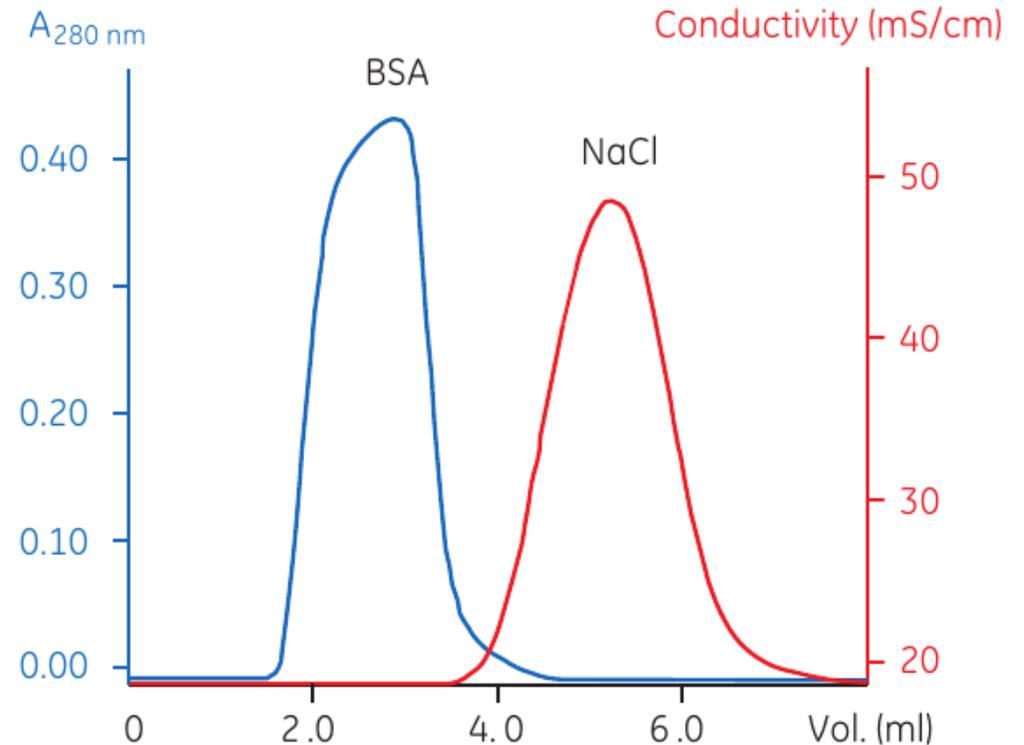
Die Überstände (je ca. 200 – 240 μ l) werden auf die zuvor mit 3 x 1 ml Lagerungspuffer equilibrierten Größenausschlusssäulen aufgetragen
Nachdem die überstehende Lösung in das Säulenbett gewandert ist wird mit 300 μ l Lagerungspuffer eluiert und das Eluat (300 μ l) wird in Protein LoBind Tubes aufgefangen
Die Proteinproben werden auf 4 °C gelagert

Beispielchromatogramm:

HiTrap Desalting, 5 ml;

2 mg/ml BSA in 50 mM NaP_i, 500 mM NaCl, pH 7.0

Probenvolumen: 28 %



Enzymtests

Im Praktikum werden für die Bestimmung der Enzymaktivität ^{14}C -markierte Verbindungen eingesetzt.

Vorteile:

Hohe Empfindlichkeit bei der Detektion

Klare Abgrenzung der Reaktionsprodukte von den in den Enzympräparationen vorhandenen Substanzen (Vermeidung von Matrixeffekten)

Ausschluß von Produkt- oder Substrathemmung aufgrund der geringen Stoffmengen, die benötigt werden

Radioaktivität

elektrostatische und Kernkräfte nicht im Gleichgewicht: **Instabile Kerne** die Abspaltung von Teilchen

Radioaktivität: spontaner Vorgang, durch den instabiler Kern Gleichgewichtszustand sucht. umso größer, je größer die Anzahl der Zerfälle.

Verschiedene Zerfallsarten:

1. Alpha-Zerfall (Teilchenstrahlung)

α -Teilchen: zwei Protonen und zwei Neutronen (Heliumkern), hohe Energie (bis zu 8 MeV), geringe Reichweite in der Luft (wenige Zentimeter). Restkern: um 2 verringerte Ordnungszahl, um 4 verringerte Massenzahl, Schutz durch Blatt Papier oder die äußersten Schichten der menschlichen Haut, Schäden vor allem bei Eintritt in den Körper.

2. Beta-Zerfall (Teilchenstrahlung)

häufigste Zerfallsart, Kerne mit großem Neutronenüberschuß. Neutron in Proton umgewandelt, entstehendes Elektron aus dem Kern ausgestoßen. Restkern: um 1 erhöhte Ordnungszahl, unveränderte Massenzahl. β -Teilchen Energie: 0,02-5,3 MeV. Reichweite in der Luft: bis zu etlichen Metern, durchdringen Gewebe von einigen Zentimetern Dicke, durch Metall- oder Kunststoffschichten abgeschirmt

3. Gamma-Strahlung (elektromagnetische Strahlung)

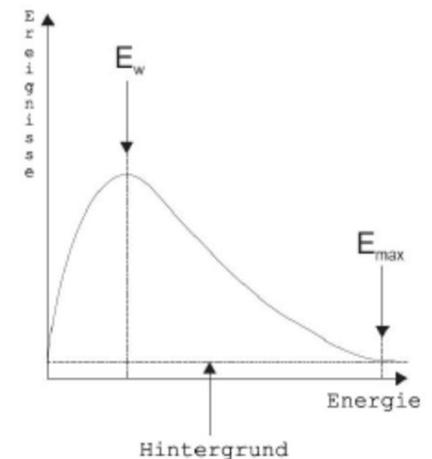
Folge radioaktiver Kernumwandlungen vieler α - oder β -aktiver Isotope, Übergang in einen energetisch niedrigeren Zustand: Abgabe von Energie durch Emission von γ -Strahlung. Energie: 0,1-2,5 MeV; nicht vollständig abschirmbar, ausreichender Schutz durch mehrere cm dicke Bleischichten oder bis zu 3 m dicke Betonwände; ausreichender Abstand zur Strahlungsquelle

Radioaktivität

Eigenschaften der am häufigsten verwendeten Radionuklide in der Biochemie und Molekularbiologie

Isotop	Halbwertszeit	Strahlungsart	Energie [meV]	Reichweite [cm]	
				in Luft	in Glas
H-3	12,26 Jahre	β	0,0018	8	-
C-14	5760 Jahre	β	0,155	65	-
P-32	14,2 Tage	β	1,71	710	0,4
S-35	87,2 Tage	β	0,167	70	-
J-131	8,04 Tage	β, γ	0,6	250	-

Energiespektrum: Anzahl der Teilchen mit einer bestimmten kinetischen Energie als Funktion der Energie. Das Energiespektrum ist für jedes Nuklid charakteristisch.



Nach dem Zerfallsgesetz sinkt die Zahl N der anfangs instabilen Kerne N_0 exponentiell mit der Zeit

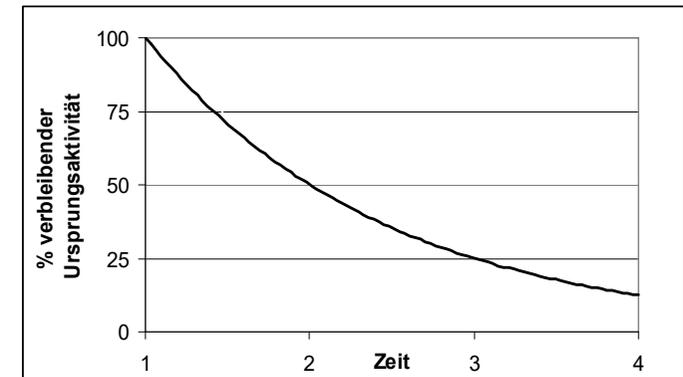
Radioaktivität

Zerfallsgeschwindigkeit: Sie ist unabhängig von äußeren Bedingungen, aber proportional zur Anzahl der vorhandenen Kerne. Der Zerfall folgt einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung.

Radioaktives Zerfallsgesetz:

$$N = N_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad -dN/dt = -k \cdot N$$

N:	Zahl der vorhandenen radioaktiven Atomkerne
N_0 :	Zahl der ursprünglich vorhandenen radioaktiven Atomkerne
$-dN/dt$:	Geschwindigkeit des radioaktiven Kernzerfalls
k:	Zerfallskonstante (Nuklidcharakteristisch)



Halbwertszeit: Zeitintervall, in dem die Aktivität eines radioaktiven Stoffes auf die Hälfte seines ursprünglichen Wertes abgesunken ist.

charakteristisch für bestimmtes Nuklid, (Sekundenbruchteilen bis zu Millionen Jahren)

Nach dem Zerfallsgesetz sinkt die Zahl $N_{(t)}$ der anfangs instabilen Kerne N_0 exponentiell mit der Zeit t

Radioaktivität

Größen und Masseinheiten

Aktivität: Maß für die Stärke der Radioaktivität, Anzahl der Zerfallsereignisse pro Zeiteinheit.

SI Einheit: **Bequerel (Bq)**,

dpm (disintegrations per minute). **Cpm** geben die Anzahl der Zerfälle an, die das Messgerät detektiert, (dpm = cpm · Zählrohrbeute).

Curie (Ci) : veraltete Maßeinheit, vor allem beim Verkauf von radioaktiven Substanzen immer noch verwendet. Curie jene Menge an radioaktivem Material, in dem die Zahl der Kernzerfälle pro Sekunde gleich ist wie in 1 g Radium ($3,7 \cdot 10^{10}/s$).

1 Bq = 1 Zerfall/ 1 Sekunde

1 dpm = 1 Zerfall /1Minute

1 cpm = 1 count (gezählter Zerfall)/1 Minute

1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq = 37 GBq

Spezifische Aktivität: radioaktive Aktivität bezogen auf die Mengeneinheit (meist mmol oder μ mol) oder die Masseneinheit (g oder kg) der radioaktiven Substanz.

Die spezifische Aktivität einer radioaktiv markierten Verbindung wird auf der Packung angegeben!

Energiedosis: massenspezifische Energiemenge, die von bestrahltem Objekt über einen bestimmten Belastungszeitraum aufgenommen wird, abhängig von der Intensität der Bestrahlung und der Aufnahmefähigkeit des bestrahlten Objekts

SI Einheit: **Gray (Gy)**

1 Gray = 1 Joule/kg

Strahlenschutzgesetz/Strahlenschutzverordnung

<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010335>

Übersicht über die in der Strahlenschutzverordnung festgelegten Freigrenzen für die gängigsten in der Forschung verwendeten Radionuklide

Nuklid	H-3	C-14	P-32	S-35	J-131
Freigrenze [Bq]	10^9	10^7	10^5	10^8	10^6

Die im Praktikum verwendeten Radioaktivitätsmengen liegen weit innerhalb der Freigrenzen (10^2 Bq/Test)

Schwangere Frauen und Jugendliche unter 18 Jahren dürfen nicht mit radioaktiven Stoffen umgehen.

Kontamination

Kontamination/Dekontamination: Nach Auftreten einer Kontamination muss der Bereich entsprechend gekennzeichnet und durch befugte Personen dekontaminiert werden. Die Strahlenschutzverordnung definiert höchstzulässige Werte der Aktivität für Hautpartien und Gegenstände.

	H-3	C-14	P-32	S-35	J-131
Hände [Bq/Hand]	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^4$
Haut außer Hand [Bq/cm ²]	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$
Oberkleidung [Bq/cm ²]	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^2$	5.10	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$
Laboratoriumsgegenstände [Bq/cm ²]	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^3$
Flächen über 100 cm ² [Bq/cm ²]	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$	10	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$

Bei Kontamination von

- ◆ Haut: sofort abwaschen
- ◆ Kleidung: sofort ausziehen
- ◆ Boden: putzen bis die Kontamination unter dem höchstzulässigen Wert liegt, Messung von 1 cm² Filterpapierstückchen am Szintillationszähler

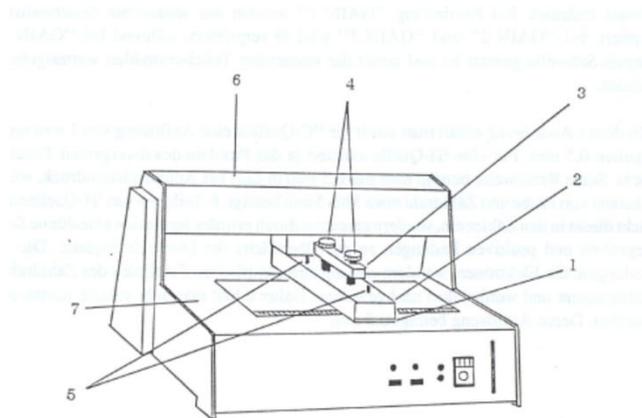
Strahlenmessgeräte

Grundsätzlich über 2 verschiedene Methoden gemessen :

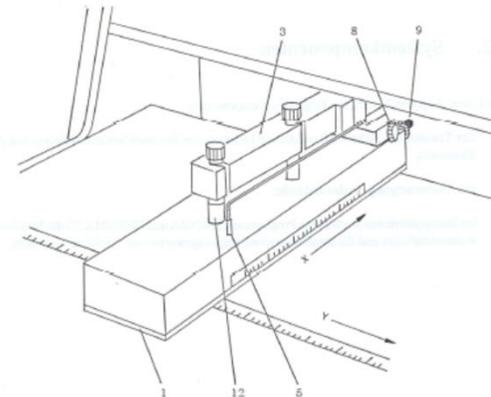
Ionisationsdetektoren mit Gasen und Festkörpern

Szintillationsdetektoren mit Flüssigkeiten und Festkörpern

TLC-Linear Analyzer: Ermöglicht die Detektion der lokalen Verteilung von radioaktiven Substanzen nach Auftrennung auf einer Dünnschichtplatte. Der Linear Analyzer zählt mit einem ortsempfindlichen Proportionalzählrohr die Bahnen auf einer Chromatographieplatte und stellt die Intensität und Ortsverteilung der Strahlung zweidimensional dar. Das Zählrohr besteht aus einem positiv geladenen Zählrohr und einigen Kathodendrähten, die über ein 15 mm breites offenes Eintrittsfenster gespannt sind. Das Zählrohr wird von einer Argon/Methan-Mischung (90/10) durchspült. Auflösung für ^{14}C -Quellen beträgt 1 mm.



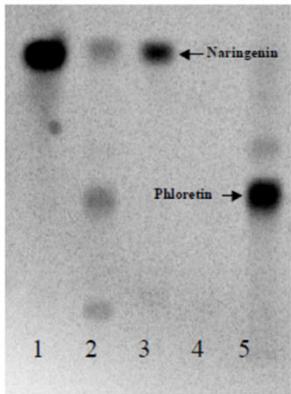
Kernstück eines TLC-Linearanalyzers
5: Zählrohr, 6: Gehäuse mit Vorschubspindel zur Bewegung des Zählrohrs entlang des Messtischs,
7: Messtisch mit Messskala



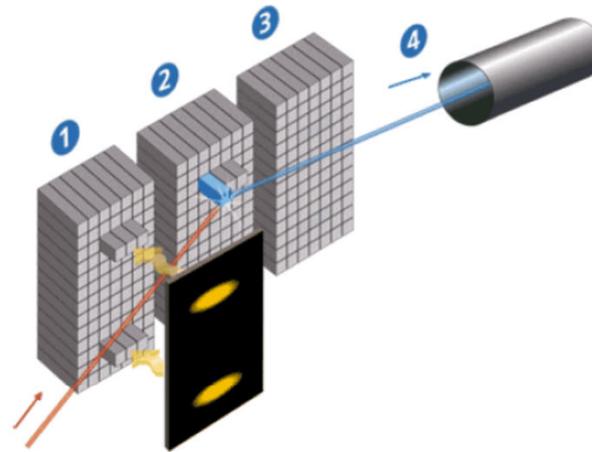
Detailansicht Zählrohr
1: Eintrittsfenster zur Drahtkammer, 3: Haltearm für Zählrohr, 5: Impulsausgang

Strahlenmessgeräte

Phosphor Imager: wird für autoradiographische Techniken verwendet und ermöglicht die Detektion der lokalen Verteilung von Radioaktivität auf ebenen Trägern (DC-Platten, Elektrophoresegele, Membranen, histologische Schnitte). Die Träger werden einige Stunden auf Storage Phosphor Screens inkubiert (analog dem Auflegen auf Röntgenfilmen). Die Screens bestehen aus radiosensitiven Speicherleuchtstoffen auf Polyesterplatten, die mit einer Schutzschicht aus Celluloseacetat bedeckt sind.



Beispiel für ein mittels Phosphor-Imager erstelltes Radiogramm einer DC-Platte.



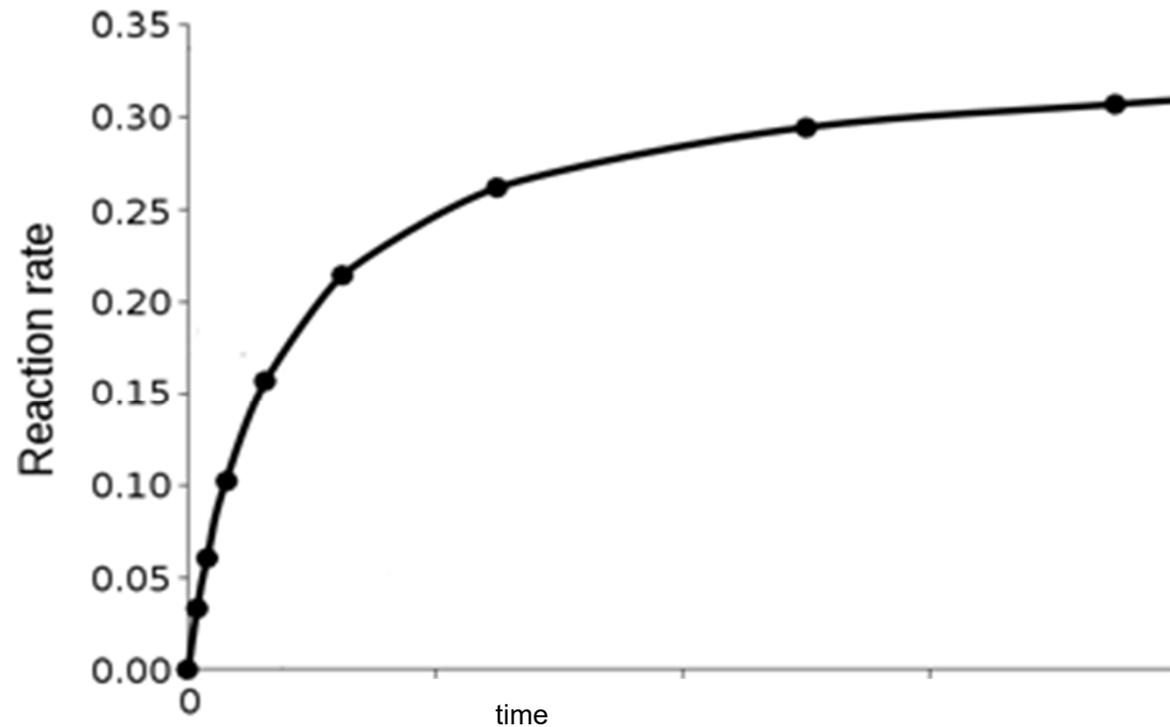
Prinzip der Messung von Radioaktivität am Phosphor-Imager:

1. Exposure of the storage phosphor screen to ionizing radiation induces latent image formation 2. During laser scanning, the BaFBr:Eu²⁺ crystals in the screen release energy as blue light 3. and return to ground state 4. Blue light is collected and measured to form a quantitative representation of the sample

Durch die radioaktive Strahlung der Probe werden die radio-sensitiven Speicherleuchtstoffe (dotierte Alkali- und Erdalkalihalogenide, meistens BaFBr:Eu²⁺ - europiumdotiertes Bariumfluorobromid) in einen angeregten Zustand überführt. Laserstimulation löst Rückkehr in den Grundzustand aus. Menge des emittierten Lichts ist proportional der Strahlungsenergie in der Probe. Digitales zweidimensionales Bild des Trägers, bei dem wie auf einem Röntgenfilm die Position der radioaktiven Substanzen durch schwarze Flecken sichtbar gemacht werden. Schwärzungsintensität erlaubt einen relativen Aktivitätsvergleich. Die einzelnen Bahnen können auch als Peakprofil dargestellt werden und über Integration der Peakflächen quantifiziert werden. Nach dem Auslesen wird der Screen mit Licht bestrahlt, um alle verbliebenen angeregten Zustände wieder in den Grundzustand überzuführen.

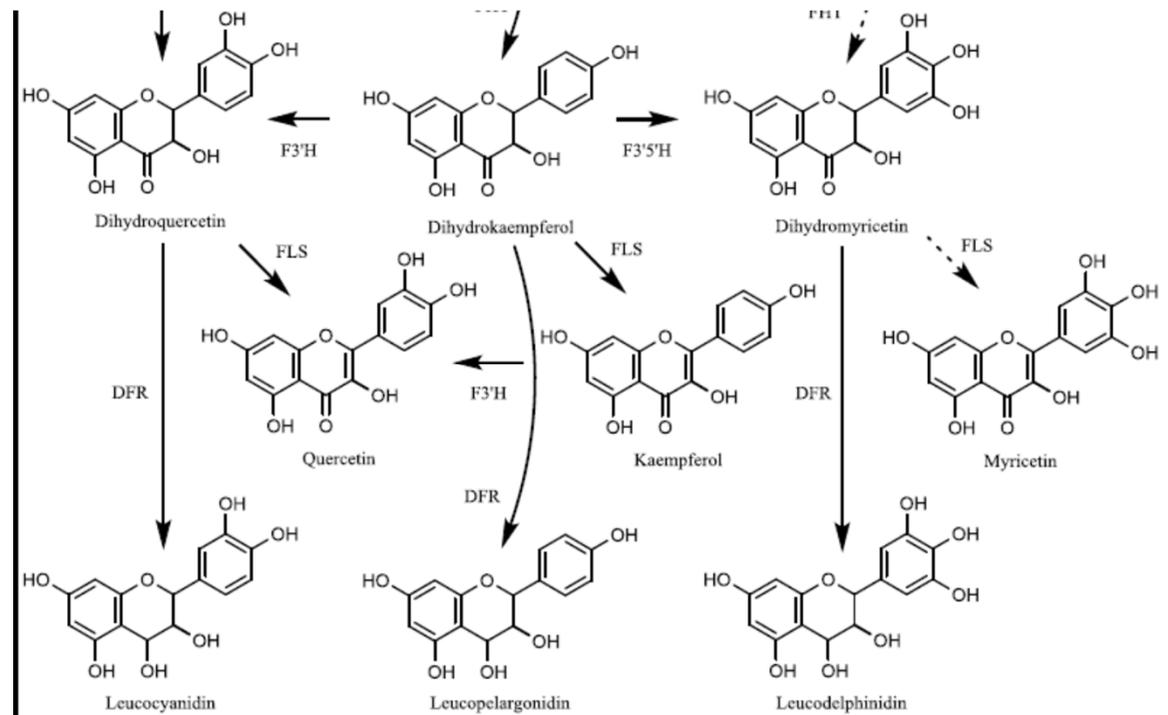
Enzymtests

- Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten soll die Umsatzrate für das bevorzugte Substrat bei ca. 50 % liegen, daher werden die Aktivitätstests (Gesamtvolumen: 50 μ l) jeweils mit 1, 10 und 25 μ l Enzymlösung durchgeführt



Enzymtests

- Jeweiligen Aktivitätspuffer in die Reaktionsgefäße pipettieren, in denen sich bereits die ^{14}C -markierten Substrate befinden: je nach Aktivitätstest 20 μl ; 35 μl bzw. 44 μl
- 5 μl NADPH-Lösung (Konzentration: 50 mM; 4,186 mg / 100 μl H_2O) zupipettieren
- Enzymlösung zugeben, durchmischen und 30 min bei 30 °C inkubieren
- DHK- und DHQ-Reaktionen: mit 10 μl HOAc stoppen, 100 μl Ethylacetat zugeben, vortexen und 3 min bei 14000 g zentrifugieren; obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß pipettieren; Extraktion mit weiteren 100 μl wiederholen und die Phasen vereinigen; die organischen Phasen der Reaktionen von DHK und DHQ werden auf Dünnschichtplatten auftragen
- DHM-Reaktionen: mit 30 μl MeOH stoppen; Reaktionsgemisch wird vollständig auf Papierstreifen aufgetragen
- Dünnschichtplatten und Papierstreifen werden in die Chromatographie-Kammern gegeben, in denen sich eine Chloroform:Essigsäure:Wasser Lösung im Verhältnis 50:45:5 befindet und über Nacht stehengelassen
- Am nächsten Tag werden die Platten entnommen, im Abzug mindestens 45 min getrocknet und anschließend am Phosphor-Imager gemessen.



Auswertung

- Die Chromatogramme werden am TLC Linearanalyzer ausgewertet
- Die relativen Umsatzraten des Wildtyps werden mit denen der Mutanten verglichen und Aussagen bezüglich der Relevanz der jeweiligen Mutation auf die Substratspezifität der DFRs getroffen

Am Tag danach oder später: Streifen aufziehen über Nacht inkubieren
Auswertung am Linear Analyzer: Ab dem 2. Tag nach der Übung möglich

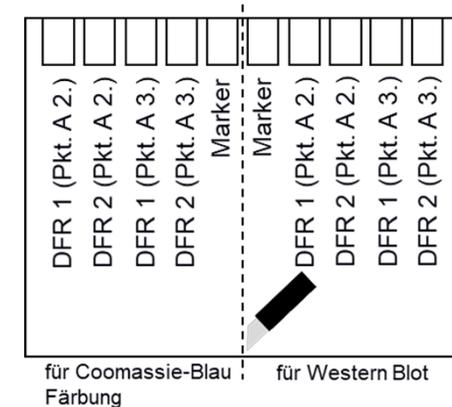
TEIL C: Western Blot Analyse

Durchführung im Abzug, Nitrilhandschuhe tragen

SDS-PAGE

Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad)

- es werden vorgefertigte Gele verwendet (1 Stück)
- der erste Teilnehmer stellt 1 L 10x SDS Laufpuffer her
- Jeder Teilnehmer Gruppe stellt daraus 1 L 1x SDS Laufpuffer herstellen
- Gel auspacken, lt Vorschrift Apparatur zusammenbauen
- die Taschen mit Laufpuffer spülen (Spritze und Nadel)
- Je 7 µl Marker in die beiden mittleren Spuren (5 und 6)
- Beide Probensätze laden (nach Aufschluss, nach Affinitätschromatographie)
- Gellauf: 80 V, 20 - 30 min (bis der Lämmli-Puffer am Gelende angekommen ist)
- eine Gelhälfte für den Western Blot weiterverwenden, auf Glasplatte belassen, feucht halten
- zweite Gelhälfte für Proteinfärbung verwenden (Coomassie Blau, Abzug, Nitrilhandschuhe)
- Coomassie Blau-Lösung werden wiederverwendet!!
- Entfärbelösungen in Entsorgungsflaschen füllen
- Gek fotografieren



Western Blot

Semi-Dry-Blotter

die erste Gruppe stellt 500 mL 10x PBS und daraus 10x PBS-T her

- Gelaktivierung mittels ChemiDoc aktivieren
- PVDF-Membran aktivieren und equilibrieren
- Aufbau des Western Blot Sandwich (lt Arbeitsvorschrift)
- 2 h bei 12 V mit 100 mA blotten
- Blot abbauen, Membran in Methanol schwenken und auf Whatman Filterpapier trocknen lassen
- Western-Blot Analyse (lt Arbeitsvorschrift, Antikörperlösungen werden wiederverwendet! Auswertung am ChemiDoc Imager

Abgabe

Geben Sie ein DIN A4 Blatt mit folgenden Angaben ab:

1. OD der Kulturen zum Zeitpunkt der IPTG Zugabe
2. Relative Umsatzraten des Wildtypenzymes und des mutierten Enzyms (18 Werte)
3. Davon Auswahl aussagekräftiger Ergebnisse/Umsatzraten treffen (9 Werte).
4. Interpretation: Welche Änderung der Substratspezifität der DFR bewirkt die Mutation
5. Beschriftete Bilder des gefärbten Gels und der Western Blot Analyse.
6. Einschätzung des Erfolges der Proteinexpression.

Bewertung des Beispiels

- ✓ Expression erfolgreich
- ✓ Enzymaktivität vorhanden
- ✓ (Richtige) Proteinmengen Auswahl
- ✓ Aktivitätswerte korrekt
- ✓ sinnvolle Interpretation
- ✓ Proteingel
- ✓ Western Blot