

Cursushandleiding

Biologische Chemie

Oktober 2008

Inhoudsopgave

Voorwoord

0. Basisvaardigheden

1. Spectrofotometrie

2. Enzymkinetiek

3. Centrifugatie

4. Gelfiltratie-chromatografie

5. Eiwitbepaling

6. Gelelectroforese

Veiligheidsvoorschriften

Voorwoord

Over dit practicum

Het maakt niet uit welke richting je kiest binnen de levenswetenschappen, vroeger of later krijg je te maken met laboratoriumwerk, of met resultaten uit laboratoriumwerk. Dit ligt voor de hand als je zelfstandig wetenschappelijk onderzoek gaat doen aan de universiteit of bij een bedrijf. Maar ook bijvoorbeeld medici hebben direct of indirect te maken artsen- of ziekenhuis-laboratoria, en moeten minimaal de resultaten van een biochemische analyse kunnen interpreteren. Dit geldt ook voor managers in de farmaceutische industrie, en voor alle andere mensen die indirect of direct met de analyse van processen in het menselijk lichaam of andere levende systemen te maken hebben. Zelfs achter de moderne online databases van genen en proteïnen gaat een grote hoeveelheid laboratoriumonderzoek schuil. Het feit dat steeds meer standaard-analyses geautomatiseerd worden neemt niet weg dat ze nog steeds gebaseerd zijn op slechts een handjevol beproefde methodes en principes.

In dit practicum zullen we zes van de belangrijkste methodes behandelen die in de praktijk gebruikt worden voor biochemisch onderzoek. Deze methodes zijn grofweg in te delen in analyse- en scheidingsmethodes. Ook in de biologie geldt “*meten is weten*”, dus analysemethodes worden gebruikt om metingen te verrichten aan cellen, moleculen en biologische systemen. Hieronder valt bijvoorbeeld het bepalen van massa's, dichtheden, omvang en structuur van “biologische bouwstenen” zoals eiwitten, nucleïnezuren, cellen en organellen. Andere voorbeelden zijn het meten van concentratie, reactiesnelheid, redox-toestand en gen-expressie en -interactie.

Voordat je het kunt analyseren moet je echter eerst het deeltje (molecuul, organel, cel) geheel of gedeeltelijk zien te isoleren uit zijn “natuurlijke omgeving”. Hier komen de scheidings- of *fractioneringsmethodes* om de hoek kijken. Hiermee kun je mengsels van bijvoorbeeld cellen of moleculen scheiden in losse componenten, op basis van eigenschappen zoals massa, omvang, dichtheid, oplosbaarheid, lading en affiniteit. De verkregen *fracties* zijn vervolgens te analyseren of weer verder te scheiden op basis van andere eigenschappen, met een andere scheidingsmethode.

In de praktijk zul je zien dat vrijwel alle methodes zowel gebruikt kunnen worden voor scheidingen als voor bepalingen. Dergelijke technieken, zoals centrifugatie, chromatografie en in mindere mate elektroforese, kunnen we dus inzetten voor zowel *analytische* als *preparatieve* toepassingen. In het practicum zullen we over het algemeen een combinatie van beide toepassingen kiezen.

De bedoeling van dit practicum is dus om kennis te maken met enkele basistechnieken die je nodig hebt om later onderzoek te kunnen begrijpen en uitvoeren (inclusief andere practica komend jaar!). Bovendien is het practicum ook bedoeld om handigheid te verkrijgen met standaard laboratorium-gereedschappen zoals pipetten en spectrofotometers, en met het maken van verdunningen en ijklijnen. Ook nauwkeurig leren werken is belangrijk, mede daarom moet je alle handelingen en resultaten bijhouden in een *labjournaal*. En tenslotte is niet alleen de toepassing van belang, maar ook de interpretatie. Hiervoor is het essentieel om het werkingsmechanisme achter de gebruikte methodes te kennen.

Over deze reader

Deze reader is uiteraard bedoeld als handleiding voor de uit te voeren proeven. Maar daarnaast bevat de reader een grote hoeveelheid achtergrond-informatie, over zowel praktische, theoretische als historische aspecten van de gebruikte laboratoriumtechnieken. We hebben geprobeerd om iedere techniek enigszins in een wetenschappelijke, biologische, historische en praktische context te plaatsen. Bovendien zijn vrijwel alle hoofdstukken voorzien van

referenties naar wetenschappelijke artikelen met meer achtergrondinformatie. Dit maakt dat de reader ook later nog te gebruiken is als naslagwerk.

Iedere proef gaat vergezeld van een aantal vragen om je begrip van de methode, de theorie en de resultaten te testen. Het is belangrijk je te realiseren dat veel van deze vragen geen eenduidig antwoord hebben. In de praktijk van het onderzoek kun je zelden zeggen dat resultaten en conclusies “goed” of “fout” zijn. De gedachtengang erachter is vaak veel belangrijker, dus daar zullen we bij het beoordelen van dit practicum vooral op letten. Veel van de achtergrondinformatie in de reader dient als voedingsbodem, om deze gedachtengang enigszins op weg te helpen. Het is bij dit practicum dus duidelijk *niet* de bedoeling dat je alles uit je hoofd gaat leren. Wees vooral niet terughoudend om de assistent vragen te stellen als je iets niet helemaal begrijpt, of om in discussie te gaan over de vragen met je groepsgenoten.

Zorg ervoor dat je het betreffende hoofdstuk van de reader door hebt gelezen vóórdat het practicum begint. Tijdens het practicum is hier geen tijd voor ingepland, en meestal heb je de theorie uit de reader nodig om je resultaten uit te werken en de vragen te beantwoorden.

Voor geïnteresseerden hebben we bij de meeste proeven extra achtergrondinformatie over het onderwerp op Blackboard gezet, in de vorm van links naar artikelen en websites. Bovendien zijn de eiwitstructuur-plaatjes in deze reader meestal voorzien van een PDB ID. Dit is een vierletterige identificatie-code voor het betreffende eiwit in de RCSB Protein Data Bank (www.pdb.org). Hier kun je allerlei informatie vinden over het betreffende eiwit. Ook veel referenties aan het eind van de hoofdstukken zijn voorzien van een DOI of PubMed ID code. De DOI (Digital Object Identifier) kun je invullen op <http://dx.doi.org> om makkelijk een online-versie van het artikel te vinden. Sommige artikelen hebben geen DOI maar wel een PubMed nummer, waarmee je het artikel snel kunt vinden in de NCBI PubMed literatuur-database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Leerdoelen

De algemene leerdoelen van het practicum zijn:

- Zelfstandig experimenten kunnen uitvoeren, waarbij je nauwkeurig, schoon en veilig te werk gaat.
- Het kunnen maken van oplossingen van de gewenste concentratie, het kunnen maken en berekenen van verdunningen, en kunnen rekenen met massa's en dichtheden.
- Om kunnen gaan met glaswerk, automatische pipetten, meetapparatuur, centrifuges en andere laboratorium-hulpmiddelen.
- Veilig om kunnen gaan met chemische en biologische stoffen, en weten wat je met afvalstoffen moet doen.
- Planning, werkwijze en resultaten bij kunnen houden in een labjournaal.
- In grote lijnen weten welke methodes er bestaan voor het scheiden van stoffen op basis van verschillende eigenschappen (voor zo ver behandeld), en een keuze hieruit kunnen maken voor een bepaalde toepassing.
- Weten welke methodes er bestaan voor het meten van concentraties, reactiesnelheid, molecuulmassa en dichtheid (voor zo ver behandeld).

Aanvullende leerdoelen bij iedere proef zijn:

- Theorie en werking van de analyse- en/of scheidingsmethode begrijpen.
- De methode in zijn basale vorm zelfstandig kunnen uitvoeren.

- De praktische context van een methode kennen (bijvoorbeeld de belangrijkste toepassingen).
- Weten wat de beperkingen van de methode zijn, en de voor- en nadelen ten opzichte van andere methodes (voor zo ver behandeld).
- De resultaten van de methode kunnen verwerken (bijvoorbeeld in berekeningen, grafieken).
- Het kunnen trekken van conclusies aan de hand van de resultaten.
- Kunnen beredeneren waarom een proef eventueel niet geslaagd is, wat de (belangrijkste) bronnen zijn van eventuele experimentele fouten, en wat er verbeterd kan worden om een beter resultaat te krijgen (discussie).

Beoordeling

Voor dit practicum krijg je een cijfer, dat meetelt voor het eindcijfer van de cursus. Bij iedere proef wordt een beoordeling gegeven door de practicum assistenten, op basis van bovenstaande leerdoelen en je algemene inzet. Bovendien is het verplicht om alle onderdelen van het practicum te doen om een cijfer te krijgen.

Voor iedere proef kun je drie mogelijke beoordelingen ontvangen: onvoldoende, voldoende of uitstekend. Een *onvoldoende* (2 punten) krijg je als je wel de proef helemaal hebt gedaan, maar je niet voldoet aan alle leerdoelen, of als je inzet onder de maat is. Een *voldoende* (3 punten) krijg je als je naar de beoordeling van de assistent hebt voldaan aan de bovenstaande leerdoelen. En tenslotte kan een assistent besluiten je een *uitstekend* (4 punten) toe te kennen, op basis van inzet, inzicht, eventuele extra proeven of de uitwerking van je resultaten. Om een goede beoordeling te kunnen geven zal de assistent tijdens het practicum rondlopen en eventueel extra vragen stellen. Ook bespreekt de assistent aan het eind van het practicum in principe met ieder groepje individueel de resultaten en de antwoorden op de vragen.

Het cijfer voor het practicum wordt bepaald aan de hand van een het aantal punten dat je opbouwt. Met de 6 proeven van het practicum zijn in totaal 24 punten te behalen. Proef nul telt niet mee voor het cijfer, maar is uiteraard wel verplicht. Je practicum-cijfer kun je berekenen door aan het eind van het practicum alle behaalde punten bij elkaar op te tellen en te vermenigvuldigen met $\frac{10}{24}$.

Tenslotte

Het belangrijkste doel van dit practicum is dat het zowel leerzaam als leuk is. En dingen zijn altijd leuker naarmate je ze beter begrijpt. Dus nogmaals, schroom niet om je practicum-assistent aan te spreken als je iets wilt weten of als je iets niet begrijpt.

En mocht je suggesties hebben voor het practicum of voor het verbeteren van deze reader, dan horen we het ook graag!

“Proef nul” — Basisvaardigheden

Eenheden en grootheden

Zoals bekend definieert het SI-stelsel (*Système International*) uit 1960 de standaard-eenheden waarin een *grootheid* zoals volume, massa, tijd, etc. wordt uitgedrukt. In de praktijk wordt in veel vakgebieden echter vaak gewerkt met niet-standaard eenheden. De volgende tabel geeft een overzicht van enkele veel gebruikte eenheden in de biochemie:

Grootheid (en afkorting)	Gebruikelijke eenheid	Notatie	Equivalent in SI eenheden
volume (V)	liter, milliliter, etc.	l	10^{-3} m^3
massa (m)	gram, milligram, etc.	g	10^{-3} kg
hoeveelheid moleculen (n)	mol, millimol, etc.	mol	mol
concentratie / molariteit (c)	molair (= mol per liter)	M, of $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	$10^3 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$
dichtheid (ρ)	gram per liter of gram per milliliter	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ of $10^3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
molare massa (M)	gram per mol	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$
molecuulmassa (M)	dalton	Da	$1.6605\cdot 10^{-27} \text{ kg}$
temperatuur (T)	graden celsius	$^{\circ}\text{C}$	K (+ 273)
energie (E)	joule	J	J
energieflux / <i>luminous power</i> (Φ of P)	watt	W	$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$
lichtintensiteit / <i>radiant flux</i> (I)	watt per steradiaal	$\text{W}\cdot\text{sr}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{sr}^{-1}$
tijd (t)	seconden of minuten (dimensieloos)	s of min AU	s of 60 s
afstand (x) en lengte (ℓ)	meter, centimeter, etc.	m	m
golflengte (λ)	nanometer (bij UV/VIS)	nm	10^{-9} m
frequentie (f)	herz	Hz	s^{-1}
snelheid (v)	meter per seconde	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
draaisnelheid (hoeksnelheid, ω)	radiaal per seconde	$\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$	$\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$
draaisnelheid (RPM)	omwentelingen per minuut	RPM	$1/60 \cdot 2\pi \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$
versnelling (a) en zwaartekrachtsversnelling (g)	meter per seconde per seconde	$\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$	$\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
centrifugaalversnelling (RCF)	zwaartekrachtsversnelling (g -waarde)	$\times g$	$0.980 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$
kracht (F)	newton	N	$\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
gewicht (w)	newton (!)	N	$\text{kg}\cdot\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$
genormaliseerde sedimentatiesnelheid (s) (sedimentatiecoëfficiënt)	Svedberg	S	10^{-13} s

Heel veel fouten worden gemaakt doordat mensen vergeten om eenheden te noteren, of de verkeerde eenheden noteren. Schrijf daarom *altijd* de juiste eenheden bij *alle* gegevens! Ook bij berekeningen is het handig om eenheden te noteren in de tussenstappen, dit vergemakkelijkt het opsporen of zelfs voorkomen van fouten in een berekening. Je kunt namelijk met eenheden rekenen, net als met getallen. Dit noemt men een *dimensieanalyse*.

Bijvoorbeeld, als je uit wilt rekenen hoeveel mol stof er in 2 ml van een 1.5 mM oplossing zit, dan kun je aan de eenheden zien of je het goed doet: $2.00 \text{ ml} \times 1.50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} = 0.002 \text{ l} \times 0.0015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} = 3.00 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$.

Als je had gedeeld in plaats van vermenigvuldigd dan had je gekregen: $3.00 \text{ ml} \div 1.50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} = 0.003 \text{ l} \div 0.0015 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} = 2.00 \text{ l}^2\cdot\text{mol}^{-1}$. De eenheden kloppen duidelijk niet in dit geval ($\frac{\text{l}}{\text{mol}} = \text{l} \cdot \frac{1}{\text{mol}}$, want delen door een breuk is vermenigvuldigen met het omgekeerde, zie het onderdeel over breuken verderop).

Een tweede voorbeeld is het berekenen van de concentratie azijnzuur (het aantal moleculen in een liter oplossing), met behulp van de dichtheid en de molaire massa: $1050 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \div 60.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 17.49 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dit is de correcte berekening, en levert dus ook de correcte eenheid.

Vermenigvuldigen van deze waardes zou echter het volgende, onjuiste resultaat hebben opgeleverd: $1050 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \times 60.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 63052.5 \text{ g}^2\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$. En het delen van de molaire massa door de dichtheid: $60.05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \div 1050 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} = 5.719 \cdot 10^{-2} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Om de schrijfwijze van eenheden wat te vergemakkelijken wordt vaak gebruik gemaakt van voorvoegsels, die staan voor een vermenigvuldiging met een macht van tien. Zo worden kleine volumes meestal uitgedrukt in ml, in plaats van 10^{-3} liter (of 10^{-9} m^3). De volgende tabel geeft een overzicht van enkele veel voorkomende voorvoegsels.:

voorvoegsel	symbool	vermenigvuldigingsfactor	betekenis
giga	G	10^9	miljard
mega	M	10^6	miljoen
kilo	k	10^3	duizend
deci	d	10^{-1}	een tiende
centi	c	10^{-2}	een honderdste
milli	m	10^{-3}	een duizendste
micro	μ	10^{-6}	een miljoenste
nano	n	10^{-9}	een miljardste
pico	p	10^{-12}	een biljoenste

Bij het omrekenen tussen eenheden met een vermenigvuldigingsfactor worden helaas veel fouten gemaakt. Een experiment kan soms geheel mislukken door het toevoegen van een factor tien teveel of te weinig van een bepaalde stof. Let dus goed op in welke eenheid iets precies staat, en bedenk goed of je moet delen of vermenigvuldigen om naar een andere eenheid te komen. Om bijvoorbeeld een volume in ml uit te drukken in liter *deel* je door duizend, want een milliliter is veel minder dan een liter dus het getal moet kleiner worden als het wordt uitgedrukt in een grotere eenheid. En andersom, om een hoeveelheid mmol uit te drukken in μmol *vermenigvuldig* je met duizend, want micromol is een kleinere eenheid dan millimol, dus het getal moet groter worden (anders zou het betekenen dat je ineens een miljoen maal minder moleculen hebt!).

Breuken en machten

Bij het omrekenen en uitrekenen van waarden zul je in de praktijk veel met breuken te maken krijgen. Dat is geen probleem zo lang je weet wat je aan het doen bent. Het gebruik van deelstrepen bij breuken leidt helaas vaak tot grote verwarring, vooral zo gauw er in een uitdrukking meer dan één breuk voorkomt. In dat soort gevallen kan het vaak handig zijn om breuken te schrijven als een negatieve macht. Als je dan consequent haakjes gebruikt en de rekenregels voor machten toepast, kan er weinig mis gaan. We herhalen hier kort de rekenregels voor breuken en machten. Bovendien zullen we de regels voor breuken helemaal uitschrijven met negatieve en positieve machten, om te laten zien dat beide notaties tot hetzelfde resultaat leiden.

Om een enigszins simplistisch voorbeeld te geven, zo weet iedereen bijvoorbeeld dat een getal gedeeld door zichzelf één is. Als je het schrijft met machten kun je ook zien waarom:

$$\frac{x}{x} = x \cdot \frac{1}{x} = x^1 \cdot x^{-1} = x^{1-1} = x^0 = 1$$

Werken met machten en breuken, enkele voorbeelden:

$$x^{-1} = \frac{1}{x}$$

$$x^{\frac{1}{2}} = \sqrt{x}$$

$$x^{\frac{m}{n}} = (\sqrt[n]{x})^m$$

$$x^{-n} = \frac{1}{x^n}$$

$$x^{\frac{1}{n}} = \sqrt[n]{x}$$

$$x^{-\frac{m}{n}} = \frac{1}{(\sqrt[n]{x})^m}$$

$$x^0 = 1$$

$$0^n = 0$$

$$x^1 = x$$

$$x^a \cdot x^b = x^{a+b}$$

$$\frac{x^a}{x^b} = x^a \cdot x^{-b} = x^{a-b}$$

$$(x^a)^b = x^{a \cdot b}$$

$$a \cdot \frac{1}{b} = \frac{a}{b} = a^1 \cdot b^{-1}$$

$$a \cdot \frac{b}{c} = a^1 \cdot b^1 \cdot c^{-1} = \frac{a \cdot b}{c}$$

$$\frac{a^n}{b^m} = a^n \cdot b^{-m}$$

$$(a^m \cdot b^n)^x = (a^m)^x \cdot (b^n)^x = a^{m \cdot x} \cdot b^{n \cdot x}$$

$$\frac{a}{b} \cdot \frac{c}{d} = a \cdot \frac{1}{b} \cdot c \cdot \frac{1}{d} = a \cdot b^{-1} \cdot c \cdot d^{-1} = a^1 \cdot c^1 \cdot b^{-1} \cdot d^{-1} = \frac{a \cdot c}{b \cdot d}$$

$$\frac{\frac{a}{b}}{\frac{c}{d}} = a \cdot (b^1 \cdot c^{-1})^{-1} = a \cdot (b^{-1} \cdot c^1) = a \cdot \frac{c}{b} = \frac{a \cdot c}{b}$$

Ofwel: "delen door een breuk is vermenigvuldigen met het omgekeerde"

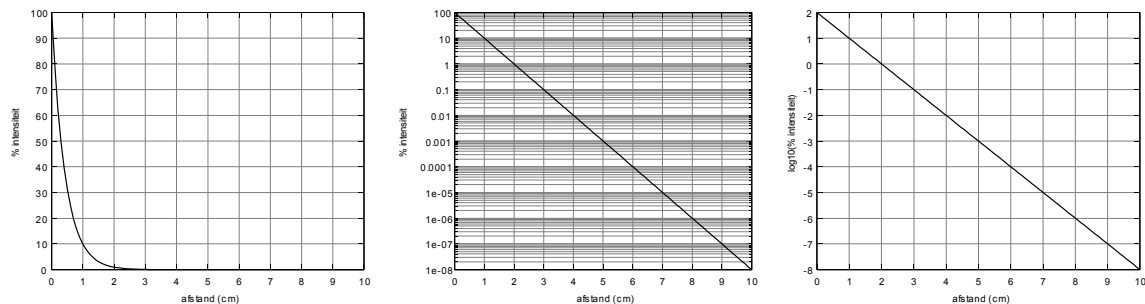
$$\frac{\frac{a}{b}}{\frac{c}{d}} = (a^1 \cdot b^{-1}) \cdot (c^1 \cdot d^{-1})^{-1} = (a^1 \cdot b^{-1}) \cdot (c^{-1} \cdot d^1) = a^1 \cdot c^1 \cdot b^{-1} \cdot d^{-1} = \frac{a \cdot c}{b \cdot d}$$

Volgorde van wiskundige bewerkingen: $() x^n \sqrt{\ } \times \div + -$

Logaritmen

Naast breuken zul je regelmatig logaritmen tegenkomen. In de praktijk worden logaritmen veel toegepast om exponentiële processen lineair weer te geven. Een voorbeeld uit de theorie van proef 1 is de afname van lichtintensiteit met afstand, als licht door een (homogeen) medium gaat. De intensiteit neemt in dit geval exponentieel af, aangezien over iedere afstand hetzelfde percentage licht verdwijnt (door absorptie en verstrooiing). Als na een centimeter door een

troebele oplossing bijvoorbeeld nog 10% van het licht over is (90% extinctie), dan is na 2 cm dus nog 1% licht over, na 3 cm 0.1% enzovoort.



Figuur 0.1 Verschillende manieren om exponentiële afname van lichtintensiteit weer te geven.

We kunnen dit op drie manieren weergeven. In de linker grafiek hebben we simpelweg de lichtintensiteit uitgezet tegen de afstand. Na 3 cm is echter de intensiteit zo klein geworden dat we de waarde niet meer kunnen aflezen. Bovendien is onze waarneming van licht (en geluid) niet lineair maar logaritmisch. Als we naar het licht zouden kijken *zien* we geen 90% reductie in lichtintensiteit per cm, maar slechts ongeveer een halvering. De grafiek is in dit geval dus ook geen goede weergave van hoe we zelf de wereld zien.

In de middelste grafiek hebben we een logaritmische schaal gebruikt voor de lichtintensiteit. Nu zijn lage-intensiteitswaarden wel goed af te lezen. Een andere mogelijkheid is om niet de lichtintensiteit te plotten maar een logaritme ervan, bijvoorbeeld de \log_{10} van de lichtintensiteit. Dit hebben we rechts gedaan, en het geeft exact dezelfde grafiek als het gebruik van een logaritmische schaal. Het nadeel is natuurlijk dat we nu niet meer direct de lichtintensiteit af kunnen lezen, alleen de “orde van grootte” ervan. Dat kan echter ook een voordeel zijn: als je alleen geïnteresseerd bent in de orde van grootte, dan hoef je bij gebruik van de \log_{10} niet langer steeds hele grote of kleine getallen te schrijven (meestal ook nog met een 10-macht erbij).

In dit geval heeft het gebruik van het logaritme nog een extra voordeel. De afname in lichtintensiteit kun je gebruiken om de concentratie van stoffen te meten. De lichtintensiteit neemt ook exponentieel af met de concentratie van een licht-absorberende stof. Dit betekent dat concentratie evenredig is met het logaritme van de intensiteit. Met andere woorden, je kunt de \log_{10} van de afname in lichtintensiteit (de extinctie) direct gebruiken als lineaire maat voor de concentratie van een licht-absorberende stof. Dat is ook precies wat we doen bij spectrofotometrie.

Andere bekende logaritmische maten zijn pH (zuurgraad), decibel (geluidsintensiteit) en bit (informatie-hoeveelheid).

Voor de volledigheid geven we hier nog even de definities en de rekenregels voor logaritmen:

Algemeen logaritme: $n = \log_a(x) \Leftrightarrow a^n = x$

Base-10 logaritme: $\log(x) = \log_{10}(x)$ $n = \log_{10}(x) \Leftrightarrow 10^n = x$

Natuurlijk logaritme: $\ln(x) = \log_e(x)$ $n = \ln(x) \Leftrightarrow e^n = x$

Rekenregels: $\log_a(1) = 0$ $\log_a(a) = 1$

$\log_a(x^g) = g \cdot \log_a(x)$ $\log_a(b \cdot c) = \log_a(b) + \log_a(c)$

$\log_a\left(\frac{1}{x}\right) = \log_a(x^{-1}) = -\log_a(x)$

$$\frac{\log_n b}{\log_n a} = \log_a b \quad (n, a, b > 0 \wedge n, a \neq 1)$$

$$\log_a \left(\frac{b}{c}\right) = \log_a (bc^{-1}) = \log_a (b) + \log_a (c^{-1}) = \log_a (b) - \log_a (c)$$

Concentraties, moleculen en volumes

De meest voorkomende berekeningen op het lab hebben te maken met concentraties en volumes. Bij het maken van een verdunning moet je bijvoorbeeld berekenen hoeveel van de oorspronkelijke oplossing toegevoegd moet worden om de gewenste concentratie te krijgen. En andersom is het vaak nodig om van een verdunde oplossing de concentratie te berekenen.

De concentratie of molariteit van een oplossing geeft aan hoeveel moleculen van de opgeloste stof er in een liter van de betreffende oplossing zitten. Als je een milliliter van die oplossing neemt, bevat deze dus een duizendste van het aantal opgeloste moleculen dat in een liter zit. De concentratie is echter hetzelfde. Als je nu echter een milliliter van de oplossing aan zou vullen met water tot een liter, dan bevat het nog steeds hetzelfde aantal moleculen opgeloste stof, maar nu in een duizendmaal zo groot volume. Het aantal opgeloste moleculen verandert dus niet bij deze verdunning, maar de concentratie is duizendmaal zo klein geworden.

De bovenstaande redenering leidt tot een relatief eenvoudige manier om concentraties en volumes te berekenen. Stel, je pipetteert een bepaald volume A van oplossing 1 in een maatcilinder, en je vult de cilinder aan met water (of buffer) tot een nieuw eindvolume B, zodat je een verdunde oplossing 2 krijgt. Bij een dergelijke verdunning blijft het aantal opgeloste moleculen gelijk. Dit aantal moleculen is te berekenen door de concentratie van de oorspronkelijke oplossing (bijvoorbeeld in $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) te vermenigvuldigen met het volume A dat van de oorspronkelijke oplossing 1 is toegevoegd (de gepipetteerde hoeveelheid, bijvoorbeeld in liter). Het resultaat is het aantal mol opgeloste stof dat aan de verdunde oplossing 2 is toegevoegd. Als je nu het eindvolume B van de verdunde oplossing 2 vermenigvuldigt met de concentratie van die oplossing, dan zou je op hetzelfde aantal moleculen uit moeten komen. Kortom:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

Ofwel, het gepipetteerde volume maal de concentratie van de oorspronkelijke oplossing 1, geeft een aantal moleculen dat gelijk moet zijn aan het totaalvolume van de verdunde oplossing 2 maal de concentratie van die oplossing. Als je drie van deze vier waardes weet, dan kun je de onbekende waarde dus berekenen. Stel bijvoorbeeld dat je 2 ml van een 1.5 mM oplossing in een buisje pipetteert, en je vult dit aan tot 3 ml. Wat is nu de concentratie van de oplossing in het buisje? Invullen in bovenstaande vergelijking geeft:

$$2.00 \cdot 10^{-3} \text{l} \times 1.50 \cdot 10^{-3} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1} = 3.00 \cdot 10^{-3} \text{l} \times C_2$$

Controleer dat het resultaat $1.00 \cdot 10^{-3} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zal zijn, ofwel 1.00 mM. Je kunt ook makkelijk zien dat het niet uit maakt welke eenheden (of eigenlijk: voorvoegsels) je gebruikt, zo lang de eenheden aan beide zijden van de vergelijking hetzelfde zijn. Op dezelfde manier kun je dus ook eenvoudig uitrekenen hoeveel water of buffer je toe moet voegen aan de oorspronkelijke 2 ml 1.5 mM oplossing om een molariteit van 1 mM te bereiken, of hoeveel van de 1.5 mM oplossing je in 3 ml moet pipetteren om een 1 mM oplossing te krijgen.

pH en buffers

De pH is een maat voor de hoeveelheid waterstof-ionen (H^+) in een oplossing. De pH beïnvloedt onder meer de oplosbaarheid van veel stoffen, en de werking en activiteit van biologische systemen (van enzymen en reactieketens tot kleine organismen).

Puur water dissocieert onder natuurlijke omstandigheden in kleine hoeveelheden H^+ en OH^- ionen. De waterstof-ionen komen niet los voor, maar zijn gebonden aan water (als hydronium-ionen, H_3O^+). Dus de dissociatie van water is: $2 H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$. Echter, vaak zie je de dissociatie-reactie simpelweg geschreven als: $H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$.

Bij $25^\circ C$ is de concentratie H^+ (dus eigenlijk $[H_3O^+]$) en OH^- ionen in zuiver water elk $1.0 \cdot 10^{-7}$ mol/L. De pH wordt gedefinieerd als de negatieve logaritme van de *activiteit* van H_3O^+ ionen in een oplossing. Voor de meeste waterige oplossingen is activiteit echter vrijwel gelijk aan de concentratie, dus kunnen we bij benadering zeggen: $pH = -\log_{10} [H_3O^+]$.

Voor zuiver water is de pH bij $25^\circ C$ dus: $-\log_{10} (1.0 \cdot 10^{-7} M) = 7.0$. Daarom zeggen we dat pH 7.0 bij $25^\circ C$ *neutraal* is. Als de concentratie H_3O^+ 10 keer groter wordt, dan neemt de pH-waarde af met 1. Dus bijvoorbeeld $1.0 \cdot 10^{-6} M H_3O^+$ geeft een pH van 6.0, enzovoort. Let op dat de pH van water afhankelijk is van temperatuur, beneden de $25^\circ C$ neemt de pH van puur water enigszins toe (tot 7.47 bij $0^\circ C$), en daarboven neemt de pH af (tot 6.14 bij $100^\circ C$).

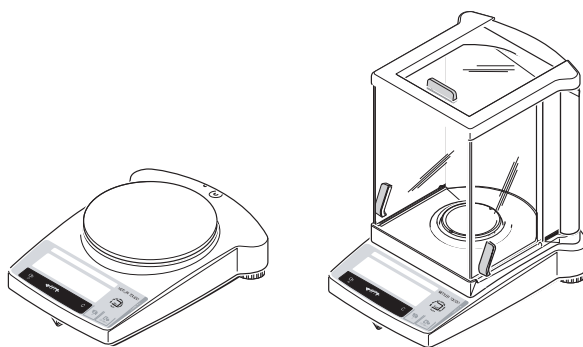
Om de pH van een oplossing enigszins constant te houden op een vooral ingestelde waarde gebruiken we meestal een *bufferoplossing*. Een buffer wordt gemaakt door zowel een zwak zuur als de bijbehorende geconjugeerde base op te lossen, meestal in ongeveer gelijke concentraties. Het zwakke zuur HB zal reageren met eventuele vrije OH^- ionen tot water en de geconjugeerde base B: $HB + OH^- \rightleftharpoons B + H_2O$.

Omgekeerd zal de geconjugeerde base B reageren met eventuele vrije H_3O^+ ionen tot water en het zwakke zuur HB: $B + H_3O^+ \rightleftharpoons HB + H_2O$. De concentraties zuur en base zullen dus wel enigszins veranderen en er stelt zich een nieuw evenwicht in, met een iets andere pH. Echter, deze pH-verandering is vele malen kleiner dan het geval zou zijn in afwezigheid van de buffer. Vanwege het evenwicht zal de concentratie H_3O^+ (en daarmee de pH) dus relatief constant blijven.

Wegen, meten en pipetteren

Massa

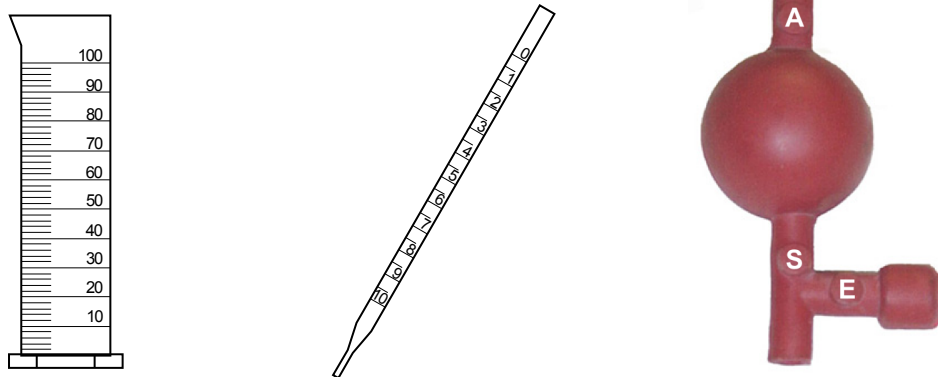
Voor afwegen van stoffen zijn op de practicumzalen twee typen balansen aanwezig. Met de *bovenweger* kunnen hoeveelheden > 500 mg met een redelijke nauwkeurigheid (± 10 mg) worden afgewogen. Met een *fijnbalans* kun je kleinere hoeveelheden afgewogen (tot enkele milligrammen), met een grotere nauwkeurigheid (± 0.1 mg).



Figuur 0.2 Een bovenweger (links) en een fijnbalans (rechts).

Volumes

Voor het afmeten van volumina gebruiken we maatglaswerk (tegenwoordig vaak ook kunststof) of pipetten. Voor het nauwkeurig afmeten van vaste volumes (bv. 50, 100 of 250 ml) kun je een *maatkolf* gebruiken. Met een *maatcilinder* kun je minder nauwkeurig maar uiteraard veel flexibeler volumes afmeten. Voor een volume kleiner dan 10 ml gebruiken we meestal een *pipet*.



Figuur 0.3 Een maatcilinder, een meetpipet en een pipetteerballon.

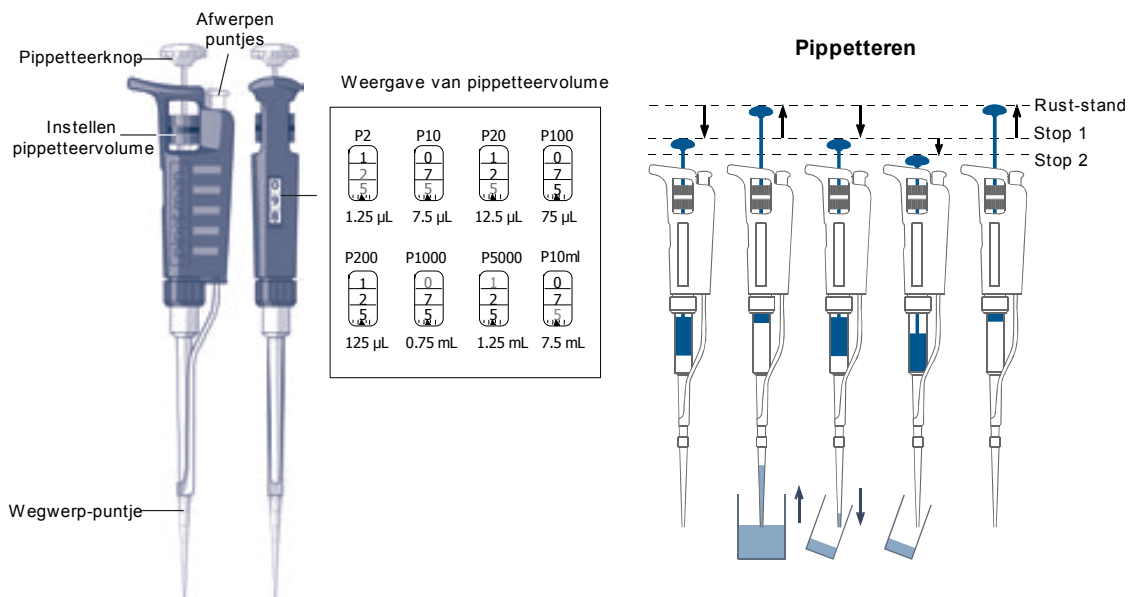
Glaspipetten (van glas of plastic) worden vaak gebruikt voor volumes van 1-10 ml. *Volpipetten* zijn glaspipetten die worden gebruikt voor het afmeten van een vast volume. Deze worden echter nauwelijks meer gebruikt. *Meetpipetten* zijn voorzien van een maatverdeling, en kunnen dus net als een maatkolf gebruikt worden om variabele volumes meet af te meten. Let bij het gebruik van glaspipet op correct gebruik. De manier van pipetteren kan soms van invloed zijn op het gepipetteerde volume, met name als je de pipet helemaal leeg laat lopen. Het is daarom aan te raden om dit soort pipetten niet te gebruiken voor pipetteren van het volledige volume, tenzij je ervaren bent in het gebruik.

Voor volumes beneden 5 ml worden tegenwoordig meestal *automatische pipetten* gebruikt. Deze worden ook wel *micropipetten* of *Gilson-pipetten* genoemd, en zijn gemaakt van kunststof. Met een stel-wieltje of knop wordt het te pipetteren volume ingesteld. Op iedere pipet wordt het maximale volume aangegeven in microliter. De meest voorkomende typen zijn P-5000 (5 ml), P-1000 (1 ml), P-200 (0.2 ml), P-20 (20 μ l) en P-2 (2 μ l). Het pipetteren gebeurt met plastic wegwerp-puntjes. Iedere keer dat van monster gewisseld wordt, moet in principe het puntje gewisseld worden. De verschillende pipetten gebruiken verschillende typen puntjes, met verschillende kleuren. Het pipetteren gebeurt door de knop in te drukken tot de eerste stop, de pipetpunt in een vloeistof te steken, en de knop langzaam los te laten. Vervolgens hou je de punt boven de houder of oplossing waar je in wilt pipetteren (tegen de wand), en druk je de knop volledig in, tot de laatste (tweede) stop. Enkele punten om op te letten:

- Pipetteer nooit zonder puntje. Let ook op dat je het juiste puntje neemt voor het type pipet dat je gebruikt.
- Let bij het instellen van het volume op de positie van de decimale punt. In principe is het volume dat wordt weergegeven in microliter, tenzij anders aangegeven (op de pipet). Vraag het bij twijfel aan de assistent. Draai de stelknop nooit verder dan het maximale volume.
- Hou de pipet nooit ondersteboven als er vloeistof in zit! Laat de pipet ook niet op de

grond vallen.

- Bij hele kleine of hele grote volumes is het verschil tussen de stops soms moeilijk te voelen. Oefen eventueel even voordat je echt gaat pipetteren, of overweeg een ander type pipet te gebruiken in dat soort gevallen (groter of kleiner volume).
- Let er bij alle typen pipetten (ook glaspipetten) op dat je geen luchtbelletjes of schuim (bv. bij eiwitten) in de pipet krijgt. Lucht in de pipet kan uiteraard het gepipetteerde volume beïnvloeden.
- In principe pipetteer je boven de vloeistof, in een hoek van 45° tegen de wand van de houder (bv. cuvet, bekeerglas, maatcilinder) waar je in pipetteert. Alleen in speciale gevallen (bijvoorbeeld de enzymen in proef 2) pipetteer je in de vloeistof.



Figuur 0.4 Automatische pipetten uit de veelgebruikte Gilson Pipetman P-serie.

Voor glaspipetten wordt een pipetteerballon gebruikt (zie figuur 0.3). Dit werkt als volgt:

- Maak de ballon goed vast aan de bovenkant van de pipet.
- Druk op **A** (*Air*), en knijp de lucht uit de ballon.
- Steek de punt van de pipet in de te pipetteren oplossing en zuig de vloeistof op door **S** (*Suck*) in te drukken op de ballon. Zorg dat je iets meer oplossing opzuigt dan dat je wilt pipetteren.
- Veeg met een tissue de buitenkant van de pipet schoon.
- Zet de pipet verticaal tegen de wand van het vat waaruit je pipetteert. Hou het vat schuin zodat de pipet een hoek van ongeveer 45° met de wand maakt.
- Druk op **E** (*Empty*) op de ballon en laat langzaam vloeistof teruglopen in het vat, tot de onderkant van de meniscus in je pipet precies op 0 staat.
- Zet nu de pipet weer verticaal tegen de wand van het vat waarin je wilt pipetteren. Hou het vat weer iets schuin, en laat met **E** voorzichtig de gewenste hoeveelheid vloeistof uit de pipet lopen.

Oplossingen maken

Voor het oplossen van vaste stoffen gebruik je meestal een bekersglas. Begin met een kleine hoeveelheid oplosmiddel, en los daarin de vaste stof op. Vul vervolgens de oplossing aan tot het gewenste volume, bijvoorbeeld in een maatcilinder. Meestal is het makkelijker om exacte volumes oplosmiddel af te meten dan een exacte massa vaste stof. Dat is zeker het geval bij grote korrels of kristallen. Je kunt in dergelijke gevallen beter iets teveel stof afwegen. Vervolgens kun je de hoeveelheid oplosmiddel aanpassen, door te berekenen hoeveel je nodig hebt om de gewenste concentratie te bereiken.

Let op bij het oplossen of verdunnen van sterke zuren of basen! Hierbij kan veel warmte vrijkomen, waardoor het in je gezicht kan spatten. Werk dus altijd in een zuurkast en voeg altijd het zuur of de base toe aan het oplosmiddel, in plaats van andersom. Het oplosmiddel zal de vrijkomende warmte absorberen, zodat het minder snel opspat.

Suffe fouten

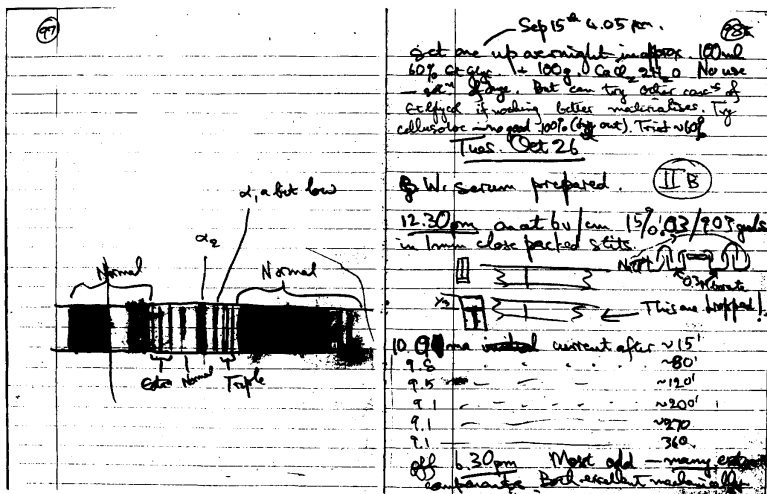
Nauwkeurig meten en goed materiaal gebruiken is erg belangrijk voor experimenteel werk. Echter, de meeste fouten worden niet veroorzaakt door onnauwkeurig meten of onnauwkeurigheid in de instrumenten, maar door verkeerd gebruik van materiaal, onoplettendheid of slordigheid. Veel voorkomende bronnen van “experimentele fouten” bij practica zijn:

- verkeerd gebruik van pipetten (bv. verkeerde type, verkeerd instellen, te ver of niet ver genoeg doordrukken, of lucht opzuigen)
- rekenfouten bij het bepalen van concentraties (bv. een factor 10-100 te hoog of te laag)
- vergeten te mengen, of onvoldoende homogeniseren
- slechte administratie (monsters niet markeren, meetwaardes of eenheden niet noteren)

Uitwerking en labjournaal

Bij het opzetten van een experiment is het erg belangrijk om *van tevoren* op te schrijven wat je precies van plan bent te gaan meten en waarom, welke materialen en stoffen je daarvoor nodig hebt, in welke verhoudingen je de stoffen moet mengen om de juiste concentraties te krijgen, enzovoort. Nog veel belangrijker is het om *tijdens* het uitvoeren van een experiment exact bij te houden wat je gedaan hebt en wat de resultaten waren. Dit is met name van belang als er iets onverwachts gebeurt of als je bent afgeweken van de planning of van een protocol, anders kun je later niet meer terugvinden wat je exact had gedaan. Ontelbare experimenten zijn al mislukt of overnieuw gedaan omdat de betreffende onderzoeker dacht “ik schrijf het later wel op”, en dat vervolgens vergat. Het is bovendien ook de moeite waard om te vermelden dat *erg veel* grote ontdekkingen in de biologie en de medische wereld min of meer per ongeluk zijn gedaan! Als de oplettende onderzoekers in kwestie hun resultaten en werkwijze niet goed hadden bijgehouden, zouden erg veel van deze ontdekkingen waarschijnlijk over het hoofd zijn gezien.

Omdat het zo belangrijk is om bij te houden wat je precies hebt gedaan, houdt vrijwel iedereen die onderzoek doet een *labjournaal* bij. Dit is simpelweg een boekje of schrift waarin je de hele dag door opschrijft wat je van plan bent, wat je hebt gedaan, wat het resultaat was, hoe je dat hebt uitgewerkt, welke ideeën je hebt voor verder onderzoek, wat je conclusies zijn, enzovoort.



Figuur 0.x Links twee pagina's uit het labjournaal van de Brits-Amerikaanse geneticus Oliver Smithies, de uitvinder van zetmeel-gelelectroforese (zie proef 6). Op 26 oktober 1954 ontdekte hij met zijn nieuwe techniek onverwacht extra eiwitbandjes bij het scheiden van bloed-serum. Aan het eind van de pagina schreef hij "Most odd — many extra components." De onbekende componenten bleken later *haptoglobinen* te zijn, bloedplasma-eiwitten die bij mensen in verschillende vormen voor kunnen komen. Deze toevallige ontdekking vormde het begin van de studie van genetische eiwit-polymorfismes. Rechts een pagina uit het labjournaal van de Zweede chemicus Per Flodin uit 1957. De pagina beschrijft een belangrijke stap in de ontwikkeling van gelfiltratie (zie proef 4). De vertaling luidt ongeveer: "A160, Dextraan gel. 100 g dextraan (DR 302-310; $|\eta|=0.195$) werd opgelost in 100 ml 2 N NaOH, tot een visceuze oplossing ontstond met veel kleine luchtbellen. Voor het oplossen werd een Brookfield-stirrer gebruikt. Aan de oplossing werd 20 ml epichloorhydrine (23.6 g) toegevoegd, dat met de hand werd gemengd tot een fijne emulsie. Gel-vorming vond plaats binnen enkele uren. De gel werd 5 uur lang verwarmd bij 50°C. De gel was breekbaar en kon makkelijk verkruid worden. De gel werd verder vermalen tot fijn poeder in een "Starmix", en werd vervolgens gewassen op een filter tot het vrij was van Cl⁻ionen (na de reactie was het neutraal vanwege de toevoeging van overmatige epichloorhydrine). Vervolgens werd het gewassen in ethanol en een nacht gedroogd in de oven. Het droge poeder woog 116 g. Het werd verder vermalen in een molen en gezeefd. Twee hoofdfracties werden verkregen, < 20 DIN en > 20 < 10 DIN. Twee gram van de meest fijne fractie (< 20 DIN) werden gezwollen in water tot een volume van 14 ml. De zwellingsfactor was 7 mg/g. Een mengsel van kleurstoffen werd op de gel gebracht in een chromatografie-kolom. Een rode fractie liep door de kolom met gedestilleerd water. Achtereenvolgens een groene en een rode fractie liepen door de kolom met een zout-oplossing."

Naast het labjournaal is ook een meer formele verslaglegging van je resultaten belangrijk. In de praktijk gebeurt dit meestal in de vorm van een rapport of een wetenschappelijk artikel, waarin een kort overzicht wordt gegeven het gedane onderzoek, en waarin de belangrijkste metingen en conclusies overzichtelijk worden weergegeven. Hiervoor zijn uiteraard de gegevens uit het labjournaal essentieel. Het weergeven van kwantitatieve resultaten gebeurt meestal in de vorm van grafieken of tabellen. Voor de juiste interpretatie hiervan is het belangrijk dat de juiste eenheden en significantie gebruikt worden.

Tijdens dit practicum moet ook een labjournaal bijgehouden worden, zodat je zelf, evenals je groepsgenoten en de assistent naderhand nog goed kunt terugzoeken wat je precies hebt gedaan, en wat de resultaten waren. Als je letterlijk een protocol volgt (zoals de werkwijze beschreven in deze practicumhandleiding) hoeft je uiteraard niet alle stappen van het protocol op te schrijven. Maar noteer wel welk protocol je volgt, en alles wat je doet dat ervan afwijkt. Verder is het ook van belang om alle resultaten *en de bijbehorende eenheden* te noteren. Als

verslaglegging hoeft je geen rapport te schrijven. Wel moet je de resultaten, de uitwerking en je conclusies netjes opschrijven. Hiervoor kun je eventueel ook je labjournaal gebruiken. Eventueel gemaakte grafieken dienen bijgevoegd te worden, en getallen moeten met de juiste significantie en in toepasselijke (of gevraagde) eenheden genoteerd worden.

Als je met een computer werkt, dan kun je het aantal cijfers achter de komma instellen op de juiste significantie. Ook kun je wetenschappelijke notatie gebruiken. Dat vereist op de computer wat gewenning, maar is wel aan te raden. Een getal $x \cdot 10^y$ wordt op een computer meestal weergegeven als xEy of xey . Het getal 0.05719 wordt dus 5.719E-02 of 5.719e-02.

Let op dat Engelstalige software meestal decimale punten gebruikt in plaats van de Nederlandse decimale komma. Zo zal een Engelstalige versie van Microsoft Excel geen getallen met komma's herkennen, en een Nederlandstalige versie geen getallen met punten. Dit kan bijvoorbeeld problemen opleveren met het knippen en plakken van meetgegevens tussen verschillende programma's. De zoek-en-vervang optie van Excel biedt hierbij uitkomst, alle komma's kunnen simpelweg vervangen worden door punten, of andersom. In deze handleiding gebruiken we voor alle getallen de Engelse notatie, dus met een decimale punt, en een komma voor duizendtallen. Deze notatie wordt het meest gebruikt in internationale publicaties. Je mag echter zelf kiezen welke notatie je gebruikt, zo lang je maar consequent bent.

Bij grafieken moeten altijd de grootheden en eenheden op de assen vermeld worden. Als er meerdere lijnen (data-series of *datasets*) geplot worden is een legenda ook noodzakelijk. Voor het maken van grafieken in Excel gebruik je in principe meestal het grafiek-type XY-Scatter. Met het tabblad "Series" (na het kiezen van het grafiek-type, of later op te vragen met de functie "Source Data") kun je vervolgens meerdere experimenten in een grafiek plotten, en afzonderlijk de x- en y-assen en de naam van iedere data-serie opgeven.

Voor het maken van ingewikkelde of hoge kwaliteit grafieken is Excel niet echt geschikt, en is speciale plotting-software aan te raden. Naast dure commerciële pakketten zijn er goede gratis programma's zoals *SciDAVis* (<http://scidavis.sourceforge.net/>) of *JPlot* (<http://jplot.sourceforge.net/>) voor (onder meer) Windows, *LabPlot* (<http://labplot.sourceforge.net/>) voor MacOS X en Linux, en *Kst* (<http://kst.kde.org/>) voor Linux.

Opdracht

Als je in een biologisch of medisch laboratorium met chemicaliën wilt werken, dan kun je deze gewoonlijk bestellen bij een groothandel. Echter, de chemicaliën worden zelden geleverd in de concentratie waarin je ze nodig hebt. Dit betekent dat je regelmatig moet uitrekenen hoeveel van een vaste stof of vloeistof je nodig hebt om een oplossing met de gewenste concentratie te krijgen. Ook bij dit practicum zul je regelmatig zulke berekeningen moeten maken.

Bereken de hoeveelheden stoffen die je moet afwegen of pipetteren om de hieronder gevraagde oplossingen te maken. Bereken ook de pH van de oplossingen als dat wordt gevraagd. Bij zoutzuur en azijnzuur moet je rekening houden met de dichtheid en het zuurgehalte (% w/w) van de beschikbare oplossingen. Noteer de antwoorden (met de berekeningen en de juiste eenheden erbij!) in je labjournaal, en laat dit zien aan de assistent voordat je weggaat.

Basisgegevens van de etiketten:

	KOH	K₂HPO₄	HCl	CH₃COOH
<i>M</i> (g·mol ⁻¹)	56.11	174.18	36.46	60.05
% (w/w)	–	–	37	100
dichtheid (g·l ⁻¹)	–	–	1190	1050

Te maken oplossingen:

HCl	100 mM is ml in	100 ml;	de pH is
	5 mM is ml van 100 mM verdund in	50 ml;	de pH is
KOH	100 mM is g in	100 ml;	de pH is
	1 mM is ml van 100 mM verdund in	50 ml;	de pH is
Azijnzuur	100 mM is ml in	100 ml;	
	1 mM is ml van 100 mM verdund in	50 ml;	
K-fosfaat	100 mM is g in	100 ml;	
	5 mM is ml van 100 mM verdund in	50 ml;	

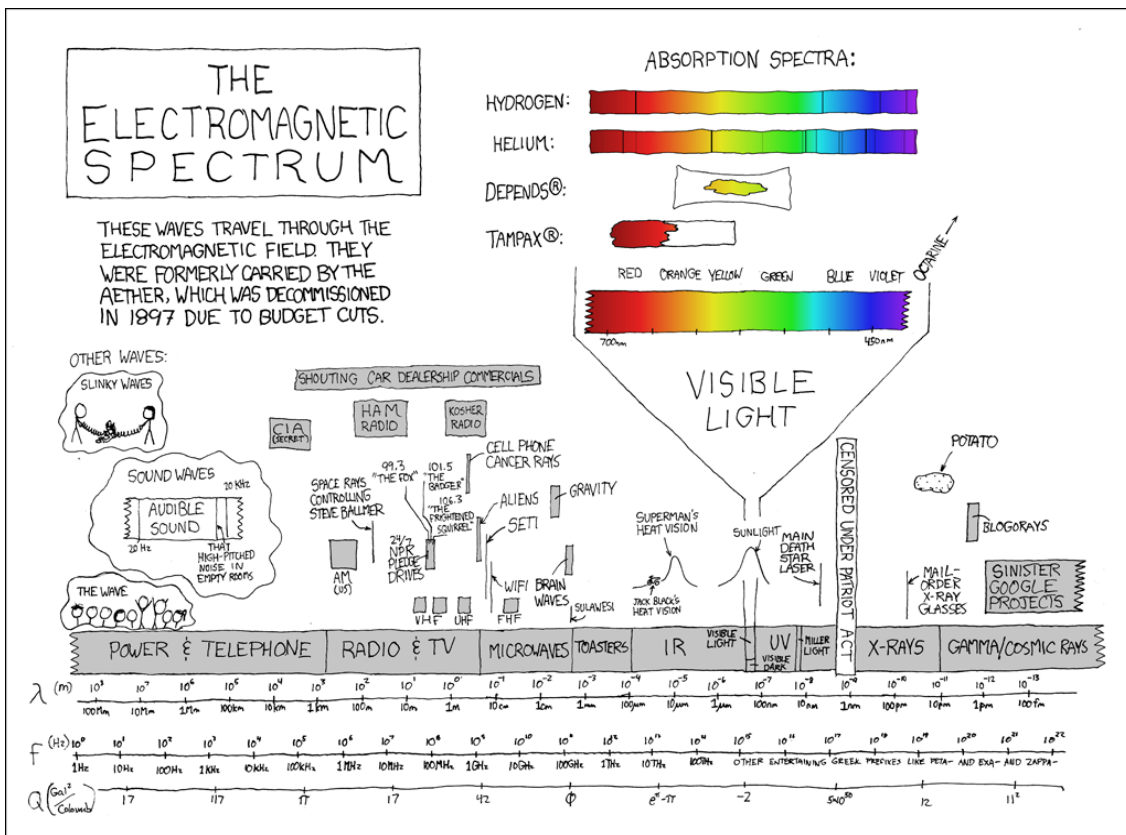
1. Spectrofotometrie

1.1 Inleiding

Een van de basisingen die je bij vrijwel ieder experiment nodig hebt is een manier om de hoeveelheid van een bepaalde stof te meten, bijvoorbeeld aan het begin en eind van een reactie. Dat is minder eenvoudig dan dat het lijkt, immers er zijn slechts enkele grootheden die we makkelijk kunnen meten: tijd, afstand (volume), temperatuur, massa en elektromagnetisme (licht, geleidbaarheid, etc.). Soms kunnen we de hoeveelheid stof bepalen aan de hand van volume of gewicht. Echter, de wet van behoud van massa maakt dit vaak lastig, bijvoorbeeld als we concentraties van een opgeloste stof voor en na een omzettingsreactie willen weten. In dat geval kunnen we vaak gebruik maken van licht.

De kwantummechanica vertelt ons dat alle moleculen energie absorberen en uitzenden bij bepaalde golflengtes. Deze eigenschap is te gebruiken om moleculen te identificeren en om concentraties te bepalen. Bovendien is het soms ook mogelijk om aan de hand van lichtabsorptie dingen af te leiden over bijvoorbeeld de structuur van een molecuul, en over de redox-staat waarin het zich bevindt. De analyse van stoffen met behulp van elektromagnetische straling noemen we *spectrometrie*. In de biologie maken we vooral gebruik van *spectrofotometrie* of *colorimetrie*, een methode waarbij we meten hoe (opgeloste) stoffen reageren op zichtbaar licht, UV en nabij-infrarood.

In dit practicum zullen we absorptiespectra en de concentratie van enkele stoffen bepalen met behulp van een spectrofotometer.



Figuur 1.1 Het electromagnetisch spectrum volgens *xkcd.org*.

1.2 Achtergrond en theorie

Electromagnetisme

Licht heeft mensen altijd gefascineerd, de Oude Grieken en Arabieren hielden zich al bezig met vraagstukken rondom optica en de aard van licht. In de 17^e eeuw woedde er een felle strijd tussen wetenschappers over de vraag of licht bestond uit deeltjes of golven. Rond dezelfde tijd probeerden diverse wetenschappers zoals Galileo en Huygens de snelheid van licht te bepalen, overigens zonder veel succes. In 1802 toonde de briljante Britse “natuurfilosoof” Thomas Young de golf-eigenschappen van licht aan. Hij deed dit met een beroemd experiment, waarin hij met twee lichtspleten een interferentiepatroon wist te creëren. De Franse natuurkundige Hippolyte Fizeau was in 1849 de eerste die met enig succes de lichtsnelheid (c) wist te meten. Met een ingenieus systeem van spiegels op heuveltoppen in Parijs leidde hij een waarde af van $3.15 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, slechts 5% verwijderd van de echte waarde $c = 2.99796 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.

De Schotse wetenschapper James Clerk Maxwell, zonder twijfel een van de belangrijkste natuurkundigen van de 19^e eeuw, kwam in 1865 met de theorie dat licht een vorm van elektromagnetisme is. Dit idee werd niet direct serieus genomen, maar in 1887 toonde Heinrich Herz met experimenten aan dat licht inderdaad een elektromagnetisch golfverschijnsel is. Hij bouwde in feite de eerste radiozender, en produceerde daarmee staande elektromagnetische golven met een bekende frequentie. Door de staande golven te meten kon Herz de golflengte van de geproduceerde straling bepalen, deze was ongeveer 4 m. Uit de mechanische golftheorie was al bekend dat er een relatie is tussen de snelheid (v), de frequentie (f , in Hz) en de golflengte (λ , in m) van een golf: $v = f \cdot \lambda$. Hiermee berekende hij de snelheid van de golf, en kwam uit op een waarde van $3 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, vrijwel exact de toenmalig bekende lichtsnelheid!

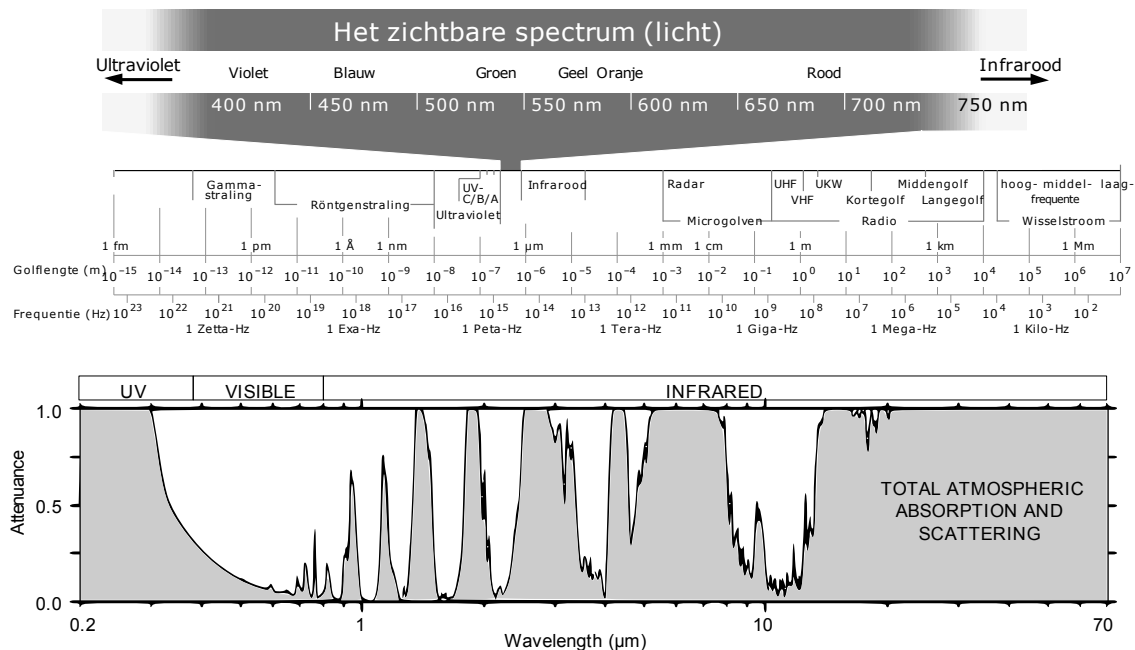
In de loop van de 19^e eeuw werden ook de theorieën rondom thermodynamica ontwikkeld. Uit experimenten met gloeiende materialen in ovens was bekend dat de kleur (of om precies te zijn, het kleur- of emissiespectrum) van een gloeiend object samenhangt met de temperatuur van de oven. Hieruit bleek dat er een relatie moest zijn tussen de golflengte van straling en de energie (in dit geval warmte). De precieze relatie tussen temperatuur en de golflengte/frequentie van uitgezonden straling werd in 1900 afgeleid door de Duitse natuurkundige Max Planck. Op basis daarvan postuleerde Albert Einstein in 1905 het idee dat elektromagnetische straling alleen voor kan komen in discrete hoeveelheden energie, die hij quanta (en later *fotonen*) noemde. In 1906 werkte hij dit verder uit: Om precies te zijn, de frequentie van een foton moet altijd een meervoud zijn van de experimenteel bepaalde waarde $h = 6.626 \cdot 10^{-34}$ (de *constante van Planck*, in J·s). Hieruit volgt de relatie tussen de energie (E , in J) en de frequentie (f) of golflengte (λ) van een foton:

$$E = h \cdot f = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

1905 was een druk jaar voor Einstein, want in dat jaar publiceerde hij ook zijn speciale relativiteitstheorie, waarin hij onder meer postuleerde dat de lichtsnelheid c constant is (in vacuüm), en dat er een relatie bestaat tussen massa en energie: $E = m \cdot c^2$.

Licht, kleur en atomen

Het deel van het elektromagnetisch spectrum dat belangrijk is voor levende organismen wordt vooral bepaald door de straling die wordt doorgelaten door onze atmosfeer (figuur 1.2). Deze straling bestrijkt het golflengtegebied van ongeveer 300-1100 nm (ultraviolet tot nabij-infrarood). Biologische processen en systemen (zoals fotosynthese en het menselijk oog) zijn perfect aangepast aan dit golflengtegebied. Wij mensen hebben in het dagelijks leven vooral te maken met zichtbaar licht, dat loopt van ongeveer 400 nm (violet) tot 700 nm (rood). Het was Isaac Newton die met prisma-experimenten tussen 1661 en 1665 aantoonde dat wat wij wit licht noemen, eigenlijk een combinatie is van licht van alle zichtbare kleuren. Dit idee werd in 1802 verder uitgewerkt in termen van golven, door de al eerder genoemde Thomas Young.



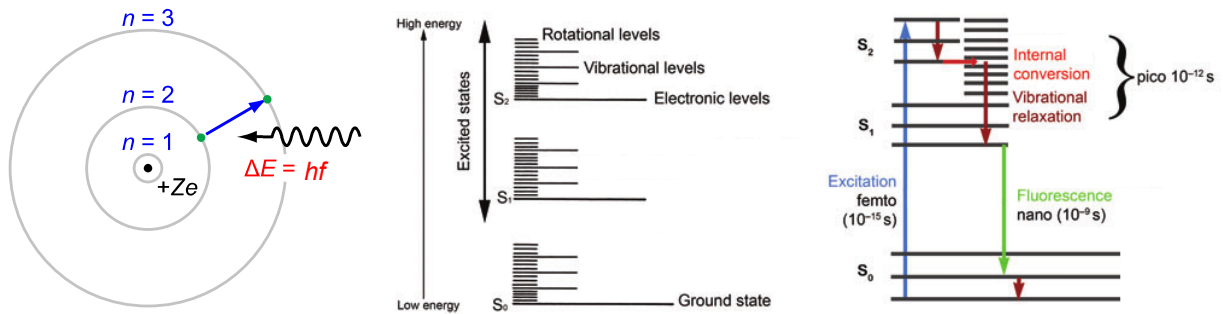
Figuur 1.2 Het zichtbare spectrum (boven), en de absorptie en verstrooiing van licht door onze atmosfeer (onder). De grijze gebieden in de onderste grafiek zijn de golflengtes die niet worden doorgelaten.

Halverwege de 19^e eeuw werd duidelijk dat ieder element in gasvorm een uniek absorptie-spectrum heeft, met absorptielijnen bij specifieke golflengtes. Lange tijd bleef echter onbekend waarom dat zo was. Pas vanaf 1904 begon langzaam duidelijk te worden hoe atomen in elkaar zitten. In 1911 postuleerde de Deense natuurkundige Niels Bohr de hypothese dat een waterstof-atoom bestaat uit een kern waaromheen een elektron draait. Het elektron kan in verschillende banen draaien, en de energie van het elektron is afhankelijk van hoe groot de baan is. “Hogere” banen hebben een hogere energie, en als een elektron terugvalt naar een lagere baan dan komt er energie vrij in de vorm van elektromagnetische straling. In 1915 realiseerde Bohr zich dat de “hoogte” van de banen alleen bepaalde waarden aan kan nemen, die samenhangen met de constante van Planck. Als een atoom geraakt wordt door een foton waarvan de energie precies overeen komt met het energieverschil tussen twee elektron-banen, dan wordt het foton geabsorbeerd en komt het elektron in een “hogere” baan (figuur 1.3). We zeggen dan dat het elektron zich in een *aangeslagen toestand* (*excited state*) bevindt. Andersom, als het elektron weer terugvalt naar een lagere baan dan stoot het (in min of meer willekeurige richting) een foton af, met een energie die gelijk is aan het verschil tussen de banen. Het model van Bohr spreekt tot de verbeelding, en bleek veel eigenschappen van waterstof goed te verklaren. Het ging echter niet helemaal op voor zwaardere atomen, met meerdere elektronen. In de jaren die volgden werd het atoom-model van Bohr daarom stukje bij beetje vervangen door de theorieën van de kwantummechanica, waaraan ook Bohr een grote bijdrage leverde.

Licht, kleur en moleculen

Aangezien een molecuul in feite een gebonden verzameling atomen is, kan het fotonen absorberen en uitzenden op ongeveer dezelfde manier als een los atoom. Een belangrijk verschil met losse atomen is echter dat er in moleculen ook energie zit opgeslagen in de bindingen tussen de atomen. Zo lang het molecuul intact blijft kunnen de atomen alleen vibreren en roteren binnen het molecuul, en deze vibratie- en rotatie-energie bepaalt mede de temperatuur van het molecuul. Naast een aangeslagen staat kan ieder atoom (of eigenlijk: iedere binding) in een molecuul dus ook vibratie-toestanden hebben (zie figuur 1.3). En net als bij de elektron-banen, kan absorptie van een bepaalde hoeveelheid energie zorgen voor veranderingen in de vibratie-toestand. Deze energie kan afkomstig zijn van aangeslagen elektronen, of van een geabsorbeerd

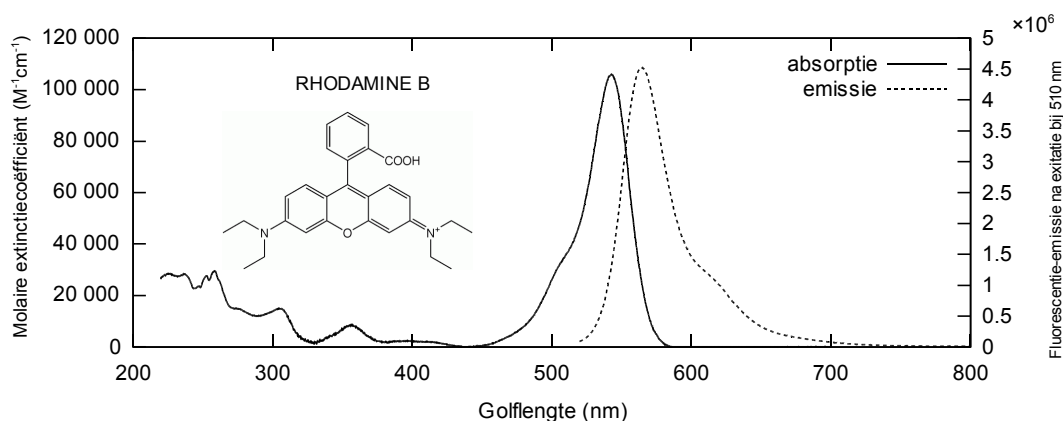
foton. Andersom, veranderingen in de vibratie-staat kunnen leiden tot het uitzenden van een foton (in het infrarode golflengtegebied). Vandaar dat een warm object infraroodstraling (“warmtestraling”) uitzendt, en dat absorptie van infraroodstraling kan leiden tot het opwarmen van een object! Iets dergelijks geldt ook voor de rotatie-staat van een atoom-binding. De energie hiervan is echter nog lager, en de geabsorbeerde en uitgezonden fotonen vallen in het microgolfgebied. (Hier is het principe van de magnetron ook op gebaseerd!)



Figuur 1.3 Links het atoommodel van Bohr. Een waterstof-atoom wordt voorgesteld als een kern waaromheen een elektron draait. Bij absorptie van een foton met de juiste energie raakt het elektron in een aangeslagen toestand, en komt het in een "hogere" baan terecht. Na korte tijd valt het elektron weer terug en wordt een foton uitgezonden met dezelfde golflengte als het originele foton.

In het midden een zogenaamd Jablonski-diagram, dat kwantum-energieniveaus van een molecuul weergeeft. De elektronenbanen (*electronic levels*) zijn bij moleculen verder onderverdeeld in energieniveaus voor vibratie- en rotatie-energie. Rechts is weergegeven wat er kan gebeuren als een molecuul een foton absorbeert. Het elektron komt op een hoger energie-niveau. Een deel van de energie zal nu echter aan de omgeving worden afgestaan als warmte, en een deel wordt omgezet in vibraties binnen het molecuul. Eventueel uitgezonden fotonen zijn daardoor van een lagere energie.

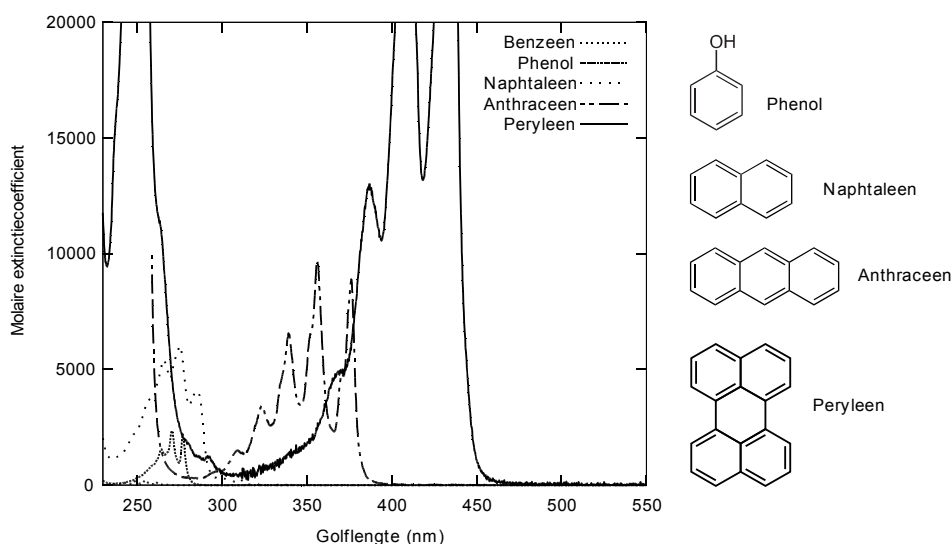
Vanwege het grote aantal elektronen en vibratie-staten hebben moleculen geen absorptie- en emissielijnen. Ze absorberen fotonen bij een groot aantal frequenties (het absorptiespectrum) en kunnen ze ook fotonen uitzenden bij een groot aantal frequenties (het emissiespectrum). De emissiegolflengtes vallen voor de meeste moleculen echter in het infrarode gebied (warmtestraling). Eventuele emissie die in het zichtbare gebied valt noemen we *fluorescentie*.



Figuur 1.4 Absorptie en fluorescentie bij de kleurstof rhodamine B (die we gebruiken in proef 4). Rhodamine B is felroze vanwege de absorptie van groen licht. Een klein deel van de energie van de geabsorbeerde fotonen wordt omgezet in vibratie- en rotatie-energie. De rest komt vrij als het aangeslagen elektron terugvalt naar de grondtoestand. Hierbij wordt een foton uitgezonden, met een lagere energie (dus een grotere golflengte) dan het geabsorbeerde foton. De uitgezonden fotonen zijn zichtbaar als oranje licht.

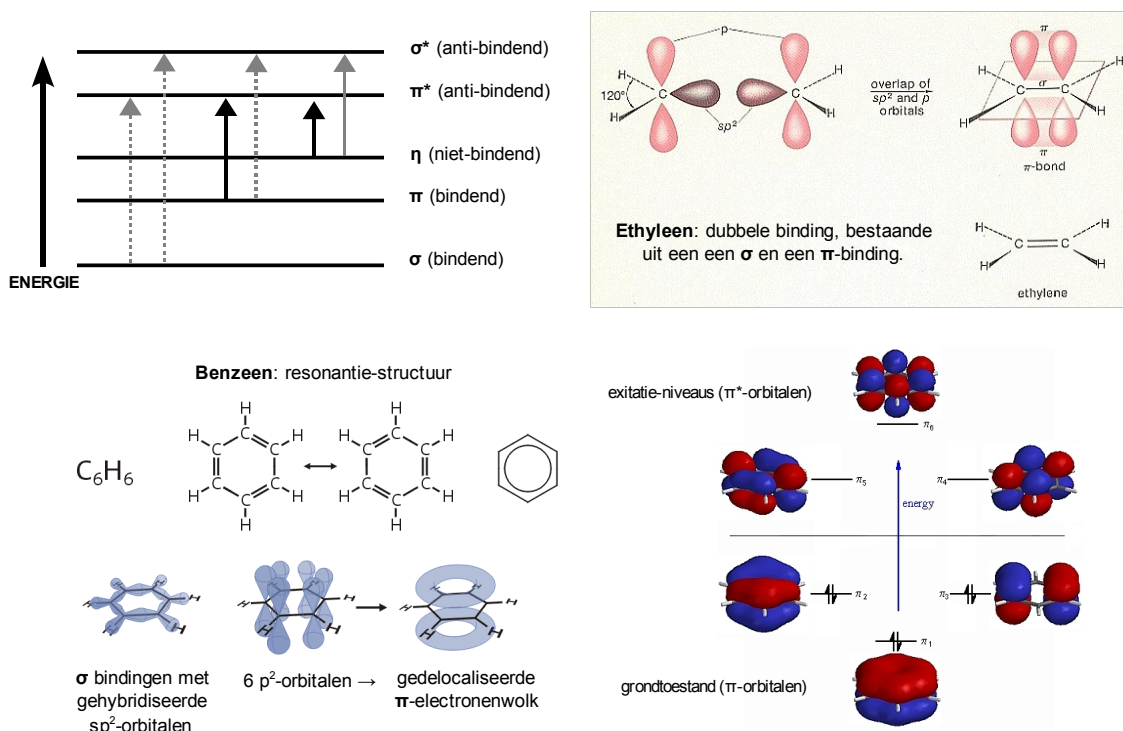
Fotonen die niet geabsorbeerd worden door een molecuul, worden doorgelaten, verstrooid (van richting veranderd) of gereflecteerd. Absorptie en verstrooiing van fotonen bepalen samen de kleur van een stof. Kleurloze stoffen (de meeste gassen, veel vloeistoffen en sommige vaste stoffen) laten de meeste (zichtbare) golflengtes door. Witte stoffen verstrooien fotonen van vrijwel alle zichtbare golflengtes, zwarte stoffen absorberen deze fotonen, en gekleurde stoffen absorberen sommige golflengtes en verstrooien anderen.

We kunnen hier niet uitgebreid ingaan op de interacties van verschillende soorten stoffen met fotonen. Echter, voor organische moleculen zijn een paar punten van belang. Een groot deel van de organische verbindingen absorbeert geen licht in het zichtbare gebied, en is dus kleurloos (of in vaste vorm vaak wit). Er zijn echter een paar omstandigheden die maken dat een organische verbinding zichtbaar licht kan absorberen: de aanwezigheid van metaal-ionen, of de aanwezigheid van ongebonden elektronen en/of geconjugeerde dubbele bindingen. De zogenaamde *transitie-metalen* zoals Fe, Mn en Ni en Cu hebben incompleet gevulde *d-orbitalen* en accepteren daardoor makkelijk fotonen. En ongebonden elektronen of geconjugeerde bindingen (figuur 1.5 en 1.6) maken het mogelijk dat een elektron tijdelijk naar een zogenaamde π^* -orbitaal kan springen, waarbij een zichtbaar foton geabsorbeerd wordt. Voor meer informatie hierover kun je kijken op Blackboard.



Figuur 1.5 Absorptie-spectra van enkele aromatische moleculen. De benzeen-ring is een goed voorbeeld van een geconjugerd systeem (zie ook figuur 1.6). Door de drie dubbele bindingen in benzeen ontstaat een *gedelocaliseerde* elektronenwolk, waardoor elektronen bij een lagere energie aangeslagen kunnen worden. De ringstructuur van benzeen versterkt dit effect nog eens. Moleculen die bestaan uit een groter aantal benzeenringen hebben over het algemeen meer delocalisatie van elektronen, en daardoor een lagere excitatie-energie. Dergelijke moleculen zullen dus vaak absorptiepieken hebben in het zichtbare gebied. In dit figuur is te zien dat een losse benzeenring slechts een klein beetje absorbeert in het nabij-UV (rond 250 nm). Toevoeging van een OH-groep leidt echter direct tot een hogere absorptie en een verschuiving van de golflengte. Ook combinaties van meerdere benzeenringen hebben dit effect.

Vrijwel alle organische kleurstoffen bevatten inderdaad meerdere benzeenringen, en/of lange ketens of netwerken van afgewisseld enkele en dubbele bindingen. Zie bijvoorbeeld de verbindingen in figuur 1.4 en 1.8. Andere elementen die delocalisatie bevorderen zijn onder meer NO_2 -groepen, en in mindere mate ook OH en NH_2 -groepen die grenzen aan een dubbele binding.

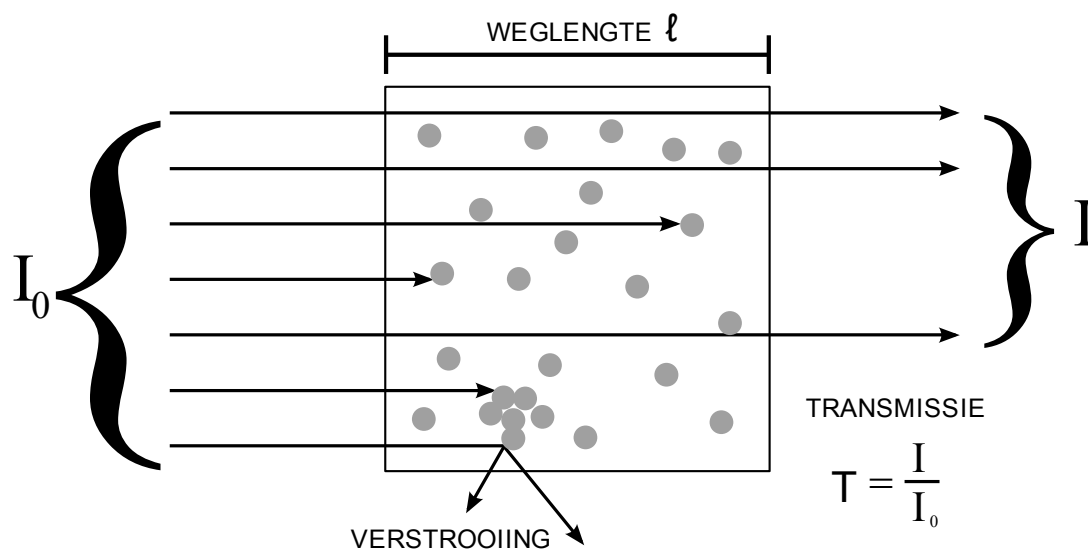


Figuur 1.6 De reden waarom dubbele bindingen de excitatie-energie van organische moleculen verlagen, moet gezocht worden in de orbitalen van de atomen. Het meest eenvoudige voorbeeld is ethyleen (rechtsboven). Een enkele binding tussen twee koolstof-moleculen wordt gevormd door het overlappen van twee sp^2 -orbitalen, die vervolgens samen een hybride σ -orbitaal vormen. De tweede binding ontstaat doordat ook de twee p^2 -orbitalen overlappen, en samen een zogenaamd hybride π -orbitaal vormen. Deze π -orbitalen nemen de vorm aan van een gedelocaliseerde elektronenwolk, waarin de elektronen uit beide p^2 -orbitalen zich vrij kunnen bewegen. Een extremer voorbeeld hiervan is benzeen (linksonder). De π -elektronenwolk verspreidt zich bij benzeen als een soort *bagel* (of donut, als dat je voorkeur heeft) boven en onder het hele molecuul. De σ - en π -orbitalen komen altijd voor in paren, waarvan de één een lage energie heeft en bindingen kan vormen, en de ander een hoge energie heeft en bindingen tegenwerkt (de zogenaamde anti-bindende σ^* - en π^* -orbitalen). Vanwege hun hoge energie bevatten de anti-bindende orbitalen meestal geen elektronen. Echter, door excitatie kunnen elektronen tijdelijk van een σ - of π -orbitaal naar een σ^* - of π^* -orbitaal springen. Dit is aangegeven in het energie-schema linksboven. De pijlen geven de mogelijke elektron-transities aan. De drie kleinste pijlen (weergegeven als doorgetrokken pijlen in zwart en grijs) zijn de enige transities die leiden tot absorptie van een foton in het zichtbare gebied. Een η -orbitaal is een orbitaal dat een niet-bindend elektronpaar bevat (deze komen bijvoorbeeld voor in O- of N-atomen). In het schema is te zien dat alleen excitatie vanuit een π - of η -orbitaal leidt tot zichtbare absorptie, en dus tot een “gekleurde” organische verbinding. Hiervoor is dus in principe altijd een π -orbitaal nodig. Het belang van méér delocalisatie in moleculen is nu dat dit het aantal π - en π^* -orbitalen vergroot. Hiermee wordt de energie-afstand tussen de grondtoestand en het dichtstbijzijnde π^* -orbitaal verkleind, waardoor een molecuul licht van een langere golflengte kan absorberen. Dit is voor benzeen weergegeven in het schema rechtsonder, waarin alle π - en π^* -orbitalen zijn getoond.

Transmissie, absorptie en spectrometrie

Transmissie (in het Engels: *transmission*) is de term die we gebruiken voor licht dat doorgelaten wordt (dus niet wordt verstrooid of geabsorbeerd). Gassen hebben een hoge transmissie bij de meeste golflengtes. Vaste stoffen hebben (bij objecten van enige dikte) meestal een hele lage transmissie (vaak nul voor zichtbare golflengtes, behalve bij glas en sommige kristallen en kunststoffen). Aan het voorbeeld van vaste stoffen kun je zien dat transmissie van licht afhankelijk is van de weg die wordt afgelegd door de stof (de *weglengte*). Dunne laagjes van een

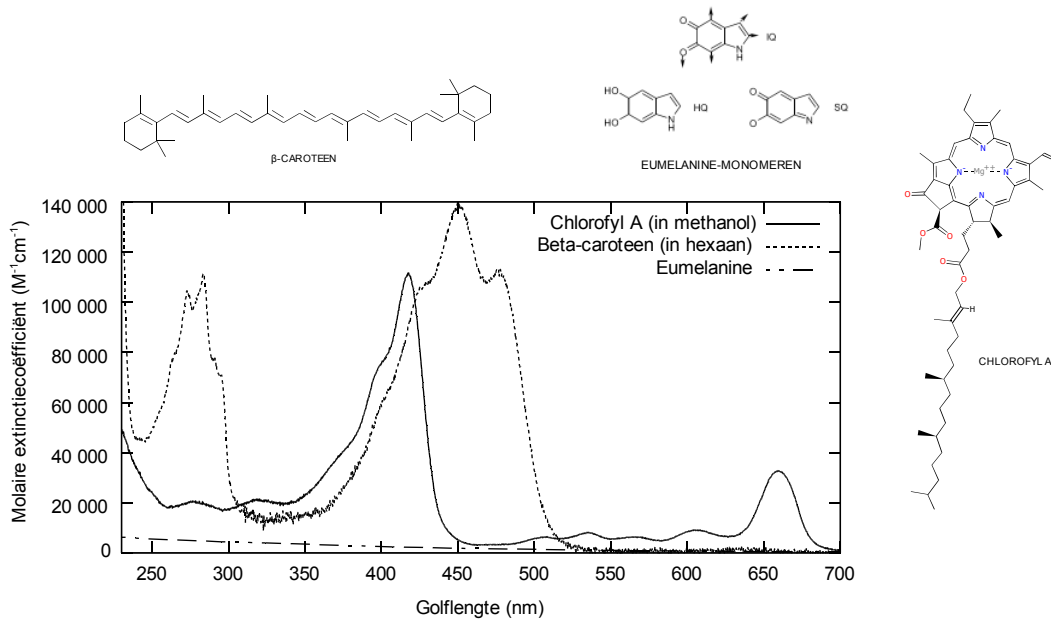
“ondoorzichtige” vaste stof laten immers vaak wel licht door, en onder een paar kilometer puur “doorzichtig” water is het aardedonker. Transmissie is uiteraard ook golflengte-afhankelijk, aangezien absorptie en verstrooiing dat ook zijn. Het is mogelijk om transmissie te meten, door een lichtbundel met een bepaalde golflengte (λ) door een stof te schijnen, en te meten wat de overgebleven intensiteit (I) is, ten opzichte van de oorspronkelijke intensiteit (I_0). Deze maat voor transmissie noemen we *transmittance*, en de techniek noemen we *absorptie-spectrometrie*.



Figuur 1.7 Transmissie, absorptie, verstrooiing

Als je een dergelijke meting bij een reeks golflengtes (op dezelfde manier) doet dan krijg je het *absorptiespectrum* van de betreffende stof. Meestal wordt hierbij uiteraard niet de transmissie van licht tegen de golflengte uitgezet, maar het omgekeerde ervan: de lichtintensiteit die verdwijnt door absorptie en verstrooiing. Dit noemen we *attenuance*. Deze term is afgeleid van *attenuation*, wat demping betekent. In het Nederlands gebruiken we echter meestal de (oude) term *extinctie*.

Het absorptiespectrum —het relatieve patroon van extinctiepieken en -dalen— is een min of meer unieke “vingerafdruk” van een molecuul, en kan dus gebruikt worden om bijvoorbeeld een stof in oplossing te identificeren. Hierbij moet echter wel bedacht worden dat de absorptie- en verstrooiings-eigenschappen van een molecuul onder meer af kunnen hangen van de structuur, de vorm, de ladingsverdeling en de elektronenconfiguratie van het molecuul, en zelfs van de omgevingstemperatuur. Het absorptiespectrum van een stof in oplossing kan dus afhangen van onder meer het oplosmiddel, de redox-toestand, de aanwezigheid van andere moleculen en de pH. Bovendien zal bij een mengsel van stoffen de extinctie van de verschillende stoffen meestal *additief* zijn, waardoor je een gecombineerd absorptiespectrum krijgt.



Figuur 1.8 Absorptie-spectra van enkele belangrijke *foto-actieve* moleculen in organismen. *Chlorofyl A* is één van de twee groene pigmenten in de chloroplasten van planten. De excitatie-energie ervan wordt omgezet in chemische energie door de elektronen-transport keten van fotosynthese. *β-Caroteen* is een ander belangrijk fotosynthese-pigment dat voorkomt in planten, en dat ook onder meer verantwoordelijk is voor de oranje kleur van wortels. Caroteen kan zijn excitatie-energie overdragen op chlorofyl. Mensen kunnen caroteen omzetten in vitamine A, dat nodig is voor de aanmaak van het oogpigment retinol. *Eumelanine* is het bruine of zwarte pigment dat in de meeste (niet-roodharige) mensen zorgt voor haar- en huidskleur. Het is in staat UV straling te absorberen, en de energie ervan snel om te zetten in warmte door interne conversie. Dit voorkomt radicaalvorming en schade aan eiwitten en nucleïnezuren, die ook absorptiepieken hebben in het UV-gebied. Eumelanine is waarschijnlijk een polymeer van de drie aromatische verbindingen indolequinone (IQ), semiquinone (SQ) en hydroquinone (HQ). De pijlen bij de structuur van de indolequinone-monomeer geven de polymerisatierichting aan. Hoe deze drie monomeren precies een melanine-polymeer vormen is echter nog niet bekend.

Lambert-Beer

Zoals gezegd wordt bij vloeistoffen de transmissie van licht bij verschillende golflengtes beïnvloed door de stoffen die erin opgelost zijn. Deze invloed wordt uiteraard groter naarmate de concentratie van de opgeloste stoffen groter is. Als we van een stof weten hoe de extinctie bij een bepaalde golflengte precies toeneemt met concentratie, dan kunnen we extinctie gebruiken om de concentratie van de betreffende stof te meten. Dit is het idee achter de *wet van Beer-Lambert-Bouguer* (in Nederland beter bekend als de wet van Lambert-Beer).

De Fransman Pierre Bouguer deed in de 18^e eeuw onderzoek naar hoe de intensiteit van licht afneemt als het door een medium (de atmosfeer) gaat. Hij ontdekte dat de intensiteit I exponentieel afneemt met de afstand die het licht* aflegt door het medium (de weglengte ℓ), en publiceerde dit in 1729. De relatie kan geschreven worden als: $I = I_0 \cdot 10^{-\alpha \ell}$. Hierbij is α de dempings- of *extinctiecoëfficiënt* (*linear attenuation coefficient*), een waarde die afhangt van het medium en de golflengte, en die aangeeft hoe snel de intensiteit precies afneemt. I_0 is de beginintensiteit, en I is de intensiteit nadat een weglengte ℓ is afgelegd. De transmittance \mathcal{T} is nu de fractie van de oorspronkelijke intensiteit die nog over is: $\mathcal{T} = \frac{I}{I_0}$. Als je dit herschrijft als $I = \mathcal{T} \cdot I_0$ en invult in de bovenstaande intensiteits-vergelijking krijg je: $\mathcal{T} = 10^{-\alpha \ell}$.

* Bouguer bestudeerde licht (dus elektromagnetische straling), maar deze exponentiële afname blijkt ook te gelden voor demping bij andere typen golven. Dat is makkelijk te begrijpen: als door een dempingsproces zoals absorptie de intensiteit halveert over een afstand x , dan zal de intensiteit een kwart van de originele waarde zijn na afstand $2x$, een achtste na afstand $3x$, enzovoort.

Aangezien we geïnteresseerd zijn in het *verlies* aan intensiteit, en onze eigen waarneming van lichtintensiteit logaritmisch is, definiëren we de extinctie of *attenuance* A als:

$A = -\log_{10} T = \alpha \cdot \ell$. De extinctie neemt dus lineair toe met de weglengte. Dit komt ook overeen met onze waarneming van lichtintensiteit. Maar let op dat dit een definitie-kwestie is, de echte lichtintensiteit (de hoeveelheid fotonen) neemt nog steeds exponentieel af met de afgelegde weg door een medium. Let ook op dat de extinctie van een medium altijd golflengte-afhankelijk is, daarom schrijven we meestal A_λ .

Tegenwoordig wordt transmittance niet meer gebaseerd op de lichtintensiteit of *radiant flux* (I in watt per steradiaal), maar op de totale energieflux of *luminous power* (Φ of P , in watt). Voor de toepassing maakt dat echter weinig uit. Transmittance en extinctie zijn beiden gebaseerd op een fractie, en zijn dus dimensieloos (ze hebben geen eenheid). Soms wordt extinctie voor de duidelijkheid echter aangeduid met de pseudo-eenheid AU (*attenuance units* of *arbitrary units*). In vaste stoffen is extinctie vaak het gevolg van verstrooiing van fotonen, maar bij vloeistoffen en opgeloste stoffen is absorptie meestal belangrijker. In gevallen waarbij verstrooiing niet of nauwelijks een rol speelt, wordt de extinctie meestal *absorbance* genoemd.

In de biologie wordt ook nog vaak de term *optical density* (OD) gebruikt. Dit is de extinctie van licht per afstands-eenheid (meestal cm): $OD_\lambda = \frac{A_\lambda}{\ell} = \alpha$ (cm⁻¹). Deze maat wordt bijvoorbeeld gebruikt om snel met een spectrofotometer de hoeveelheid cellen in een celcultuur te kunnen schatten. Verder is in de meeste standaard laboratorium-cuvetten de weglengte 1 cm, zodat de extinctie A_λ dezelfde waarde heeft als de OD_λ .

De relatie tussen afstand en intensiteit wordt wel de wet van Bouguer of de wet van Lambert genoemd (naar de Zwitser Johan Heinrich Lambert, die in 1760 publiceerde over hetzelfde onderwerp). In de tijd dat Bouguer en Lambert hieraan werkten was echter niet bekend wat precies de oorzaak was van het verlies in lichtintensiteit dat ze beschreven. In de loop van de decennia werd langzaam duidelijk dat het verlies voornamelijk werd veroorzaakt door de golflengte-afhankelijke verstrooiing en absorptie van licht door gassen, vloeistoffen en opgeloste stoffen (al waren moleculen nog niet ontdekt). In 1852 breidde de Duitse natuurkundige August Beer de wet van Lambert-Bouguer uit met het effect van concentratie. Als een opgeloste stof licht van een bepaalde golflengte absorbeert of verstrooit, dan neemt de mate van extinctie, en dus de waarde van de extinctiecoëfficiënt α evenredig toe met de concentratie van de opgeloste stof. In het geval waarbij de extinctie door de stof veel sterker is dan de extinctie van het oplosmiddel, geldt: $\alpha = \varepsilon_\lambda \cdot c$. Hierbij is c de concentratie van de opgeloste stof. De constante ε_λ is een nieuwe extinctiecoëfficiënt, die de extinctie van de opgeloste stof geeft per concentratie-eenheid (meestal M of mM) en weglengte-eenheid (meestal cm), voor licht met golflengte λ . Deze extinctiecoëfficiënt is makkelijk experimenteel te bepalen, als je de extinctie van enkele oplossingen meet met een bekende concentratie en daarmee een ijklijn maakt. De waarden zijn soms ook in de literatuur te vinden, maar let op dat ze samenhangen met het absorptie-spectrum van de opgeloste stof, en dus afhankelijk zijn van het oplosmiddel, pH, temperatuur, etc.

Samengevat, de wet van Beer-Lambert-Bouguer geeft dus de relatie tussen de concentratie c van een opgeloste stof die licht absorbeert bij golflengte λ , de afgelegde lichtweg ℓ door de oplossing, en de extinctie A_λ van licht van de betreffende golflengte:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot \ell$$

Het meten van extinctie is de meest gebruikte methode om de concentratie van opgeloste stoffen te bepalen. Het is uiteraard alleen mogelijk als een opgeloste stof een duidelijke absorptie-piek heeft bij een bepaalde golflengte, die niet samenvalt met absorptie-pieken van het oplosmiddel of andere opgeloste stoffen. Bovendien geldt het lineaire verband tussen extinctie en concentratie niet meer bij hoge concentraties. Bij extinctie-waarden groter dan ongeveer 2 AU krijg je onder meer last van het *schaduw-effect*. Dit houdt in dat deeltjes bij hoge concentraties relatief vaak in elkaars lichtweg zullen zitten, zodat de extinctie minder snel toe zal nemen met concentratie. Ook kan aggregatie van moleculen bij hoge concentraties zorgen voor extra

verstrooiings-effecten, die de extinctie beïnvloeden.

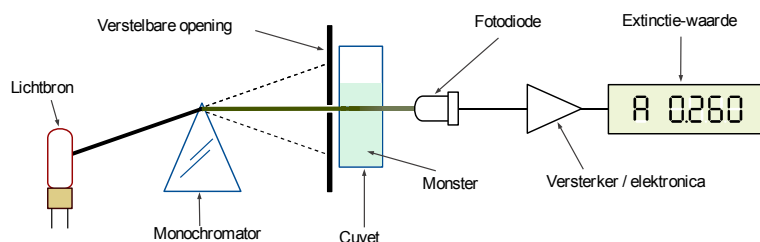
De spectrofotometer

Een *spectrofotometer* is het instrument dat we gebruiken om transmissie te meten, meestal in het zichtbare- en UV-gebied (*UV/VIS spectrometry*) maar soms ook in het infrarode gebied (*IR spectrometry*). De verzamelnaam voor deze technieken (samen met anderen zoals AAS) is absorptie-spectrometrie (*absorbance spectrometry* of *absorption spectrometry*). Daarnaast bestaat er ook nog emissie-spectrometrie, waarbij niet de transmissie van licht door een stof gemeten wordt, maar de emissie na het aanslaan van elektronen. Hieronder valt ook fluorescentie-spectrometrie, een techniek die ook in de levenswetenschappen tegenwoordig veel gebruikt wordt om onder meer eiwitten te analyseren.

De meeste spectrofotometers bestaan in essentie uit een lichtbron, een monochromator en een detector. Als lichtbron wordt meestal een wolfram- of halogeenlamp gebruikt voor zichtbaar licht, en een deuterium- of kwiklamp voor UV. Tegenwoordig gebruiken steeds meer spectrofotometers echter ook halfgeleider-lichtbronnen (LEDs). Een monochromator splitst het licht op in smalle golflengtegebieden, en bestaat vaak uit een prisma of een diffractie-tralie (*holographic diffraction-grating*). Als detector wordt vaak een fotodiode gebruikt. Moderne apparaten gebruiken soms een CCD (*Charge Coupled Device*, de lichtgevoelige chip die ook in digitale camera's zit). In combinatie met een prisma kan deze meerdere golflengtes tegelijk onderscheiden, zodat een monochromator niet nodig is.

Het licht van de lichtbron wordt door een oplossing geleid. Om te zorgen dat de lichtweg en de materiaaleigenschappen van de vloeistofhouder constant zijn, worden *cuvetten* gebruikt. Dit zijn doorzichtige, rechthoekige vloeistofhouders met een vaste breedte (meestal 1 cm voor UV/VIS). Wegwerpcuvetten zijn meestal van kunststof, maar laten geen UV door. Voor metingen in het UV-gebied moeten daarom kwarts-cuvetten gebruikt worden. Bij *double-beam* instrumenten wordt de lichtbundel in tweeën gesplitst (met een *beam-chopper* of een halfdoorzichtige *beam-splitter*), en tegelijk door de te meten oplossing en door een referentie-oplossing geleid. De referentie-oplossing is nodig omdat de cuvet, het oplosmiddel en eventueel andere opgeloste stoffen (bijvoorbeeld van een buffer-oplossing) ook licht absorberen. De intensiteit van het licht uit de referentie-oplossing wordt gemeten, en gebruikt als I_0 (tegenwoordig P_0). De intensiteit van het licht uit de meetcuvet wordt gebruikt als I (tegenwoordig P), en uit de verhouding van de twee intensiteiten (fluxen) wordt de transmittance T berekend. Meestal berekent het apparaat echter ook direct de extinctie, en geeft deze weer op een display.

Voor eenvoudige metingen wordt vaak een goedkopere *single-beam* spectrofotometer gebruikt. Deze heeft maar één lichtbundel, dus hierbij moet je voor het verrichten van je meting eerst de I_0 bepalen door een referentie-oplossing te meten en de spectrofotometer daarmee “op nul te stellen”. Dergelijke spectrometers meten meestal de transmissie bij één enkele golflengte (of eigenlijk in een heel smal golflengtegebied). De duurdere instrumenten kunnen snel achter elkaar (of bij een CCD zelfs in één keer) de extinctie bij meerdere golflengtes meten, zodat snel een absorptiespectrum van een monster gemaakt kan worden.



Figuur 1.9 Een schematische voorstelling van een eenvoudige *single-beam* spectrofotometer.

Geavanceerde toepassingen

Voor metingen waarbij een hoge gevoeligheid belangrijk is bestaan er ook *dual-wavelength* spectrometers. Deze meten tegelijk de extinctie in een monster bij twee verschillende golflengtes. Dit maakt het mogelijk om het verschil tussen twee extinctie-waarden te bepalen, zelfs bij een hoge achtergrond-absorptie (bijvoorbeeld in suspensies). Door één van de golflengtes te kiezen in een gebied waarbij geen veranderingen verwacht worden, en beide extincties over de tijd te meten kan bijvoorbeeld met grote nauwkeurigheid de oxidatie en reductie van eiwitten (zie onder) in de ademhalingsketen gevolgd worden.

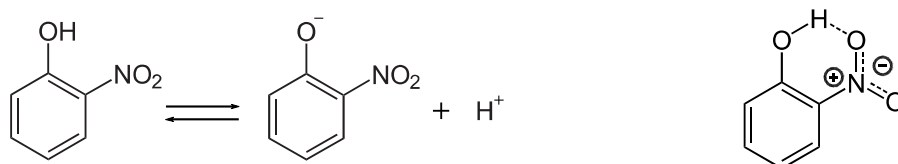
Naast de beschreven UV/VIS spectrofotometers zijn er ook instrumenten die kunnen meten in het ver-infrarood en het ver-UV. Infrarood-spectrometers kunnen onder meer gebruikt worden de structuur en structuurveranderingen van moleculen te meten, omdat ieder type covalente binding unieke vibratie-energieniveaus heeft. Iedere soort binding kan dus een bepaalde golflengte fotonen in het IR-gebied absorberen, zodat het absorptie-spectrum informatie kan geven over de structuur van (eenvoudige) moleculen.

1.3 Over de proef

In dit practicum gaan we het absorptie-spectrum van twee verschillende opgeloste stoffen meten, bij verschillende chemische omstandigheden (redox en pH). Ook zullen we millimolaire extinctiecoëfficiënten van een van de stoffen bepalen met behulp van ijklijnen. Een van deze extinctiecoëfficiënten hebben we nodig voor de meting van reactiesnelheden in proef 2. De stoffen waarvan we de absorptiespectra gaan bepalen zijn *ortho-nitrophenol* (ONP) en *cytochrom c*.

ONP

Ortho-nitrophenol bestaat uit fenol met daaraan gebonden een nitraatgroep. In proef 2 zullen we de vorming van ortho-nitrophenol uit *ortho-nitrophenol- β -galactoside* (ONPG) meten, om daaruit de snelheid van een enzymreactie te bepalen. De splitsing (hydrolyse) van ONPG in ONP en β -galactose wordt gekatalyseerd door het enzym β -galactosidase, dat in organismen gebruikt wordt om onder meer melkzuur af te breken. ONPG heeft geen absorptiepieken in het visuele gebied, maar ONP wel. Daarom is de hydrolyse-reactie van ONPG goed te meten, en wordt deze vaak gebruikt om de activiteit van β -galactosidase enzymen te bepalen. Deze enzymen worden in bacteriën gecodeerd door het *lacZ*-gen. Dit gen wordt regelmatig gebruikt om genetisch-gemanipuleerde bacteriën te selecteren, omdat de aan- of afwezigheid van een intact *lacZ*-gen makkelijk te meten is aan de hand van ONP-vorming in een medium met ONPG. Deze toepassing zal verder behandeld worden in de cursus Microbiologie, later dit jaar.



Figuur 1.10 Ortho-nitrophenol (ONP) is in water een zwak zuur (links), en is bovendien in staat om interne waterstofbruggen te vormen (rechts).

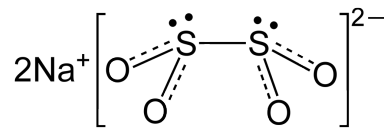
Van ONP gaan we het absorptiespectrum bepalen in water onder neutrale (pH 7.0) en basische omstandigheden (pH 10.5). We gebruiken een spectrofotometer die aangesloten kan worden op een computer, zodat we makkelijk absorptiespectra kunnen maken. Vervolgens bepalen we bij welke golflengtes ONP het sterkst absorbeert. Voor deze golflengtes bepalen we het verband

tussen extinctie en concentratie, door de extinctie te meten van een reeks oplossingen met oplopende ONP-concentratie. Aan de hand daarvan kunnen we een ijklijn maken. De richtingscoëfficiënt van deze ijklijn is de extinctiecoëfficiënt van ONP onder de gegeven omstandigheden.

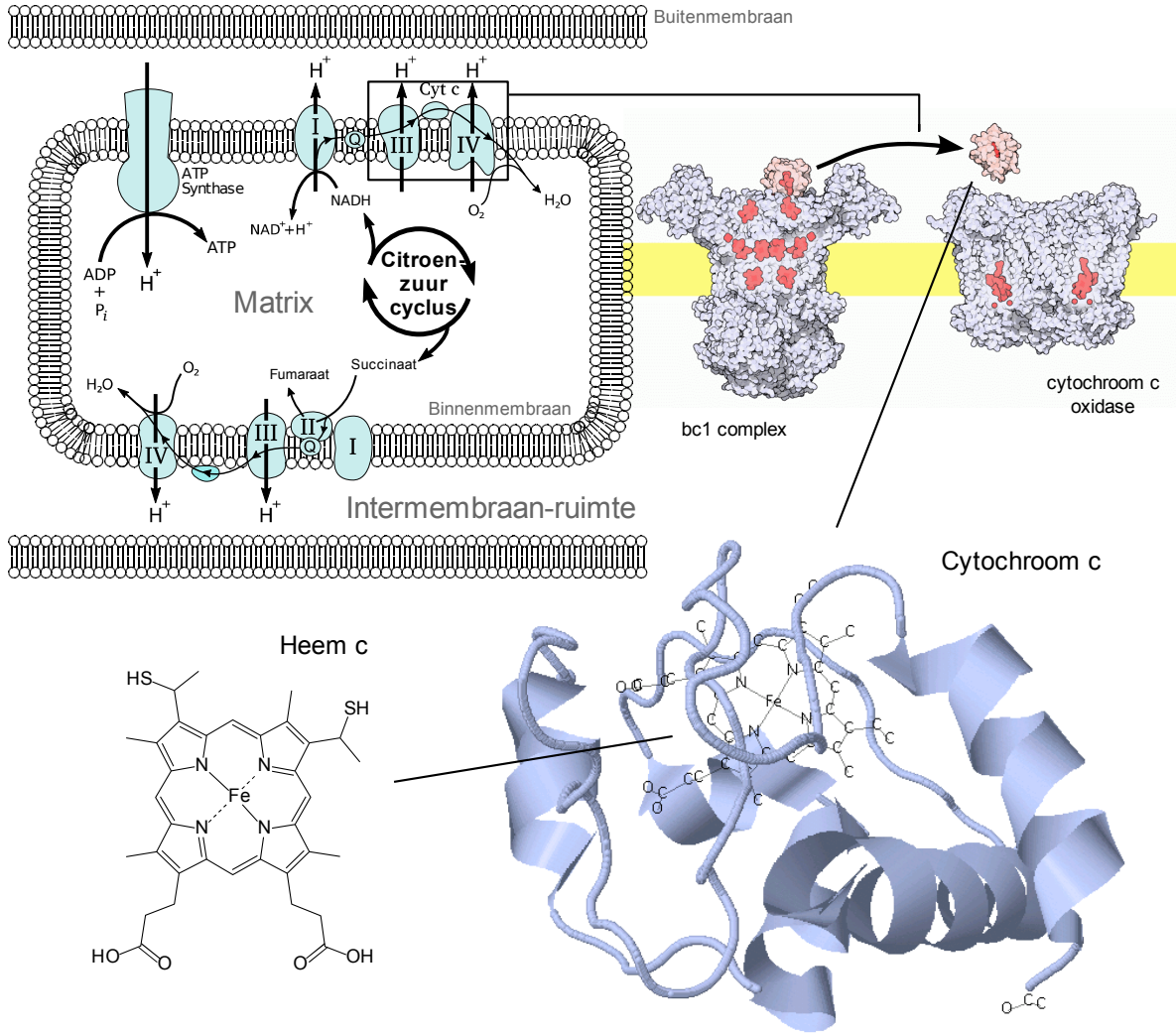
Cytochroom c

Cytochroom c is een relatief klein, water-oplosbaar en zeer goed geconserveerd eiwit, dat een belangrijke rol speelt in de ademhalingsketen. Het komt onder meer voor in mitochondriën, waar het zorgt voor de overdracht van elektronen tussen complex III (het *cytochrome bc₁ complex*) en complex IV (*cytochrome c oxidase*). Deze elektronen zijn afkomstig van NADH uit de citroenzuurcyclus, en worden uiteindelijk overgedragen op zuurstof, waarbij water ontstaat. De energie die vrijkomt bij deze stapsgewijze elektronenoverdracht wordt gebruikt door de complexen om H⁺-ionen uit de mitochondriale matrix te pompen. De H⁺-gradiënt die daardoor ontstaat wordt vervolgens gebruikt door ATP-synthase om de energiedrager ATP te produceren, voor gebruik elders in de cel. Het gedeelte van cytochroom c dat voor de elektronenoverdracht zorgt is de zogenaamde *heem c* groep. Deze groep bevat een ijzer-molecuul, dat wordt gereduceerd tot Fe²⁺ door het bc₁ complex, en vervolgens weer wordt geoxideerd tot Fe³⁺ door cytochroom c oxidase.

Ook van cytochroom c zullen we het absorptiespectrum in water bepalen, maar ditmaal in aan- en afwezigheid van een sterk reductiemiddel. De reductor die we gebruiken is het zout *natriumdithioniet* (natriumhydrosulfiet, Na₂S₂O₄). Opgelost in water levert dit een dithioniet anion (S₂O₄²⁻), dat een elektron afstaat aan Fe³⁺ in de *heem c* groep van cytochroom c.



Figuur 1.11 Natriumdithioniet, een sterke reductor.



Figuur 1.12 Linksboven een schematische weergave van de ademhalingsketen in een mitochondrium. Rechtsboven een close-up van de membraancomplexen III en IV, en de rol van cytochroom als transporteiwit voor elektronen. Rechtsonder de structuur van cytochroom c (PDB ID: 1hrc), met de heem c groep in het midden. Linksonder de structuur van de heem c groep.

1.4 Handleiding

Benodigheden

- 2 mM ONP in 0.1 M KNaP buffer (pH 10.5)
- 2 mM ONP in 0.1 M NNaP buffer (pH 7.0)
- ONP-oplossingen met onbekende concentratie
- 0.1 mM KNaP buffer
- 0.4 g·l⁻¹ cytochroom c (uit paardenhart)
- natriumdithioniet
- 3 ml cuvetten, parafilm, spatel, pipetten

Werkwijze

Eerst bepalen we het absorptie-spectrum van ONP bij pH 7.0 en 10.5, in het golflengtegebied van 350-650 nm.

- Pipetteer beide ONP oplossingen in twee losse 3 ml cuvetten.
- Maak een derde cuvet met alleen KnaP-buffer, om de achtergrondextinctie van de buffer te kunnen bepalen. Het absorptiespectrum van de buffer gebruiken we als referentie (I_0).
- Meet de absorptiespectra in alledrie de cuvetten met de spectrofotometer en computer. De instructies hiervoor verschillen enigszins per model en software-versie, dus deze zijn aanwezig op de practicumzaal.
- Kopieer de absorptiegegevens naar een spreadsheet, en sla deze op onder je groepsnaam.
- Maak indien nodig een grafieken van de absorptiespectra, door de golflengte (x-as) uit te zetten tegen de gemeten extinctie-waarden (y-as).

Aan de hand van de zojuist gemaakte absorptie-spectra zoeken we de absorptiepieken. Met een ijklijn gaan we de vervolgens de extinctiecoëfficiënten meten van ONP in KnaP bij pH 7.0 en 10.5.

- Kies aan de hand van de absorptie-spectra voor beide pH-waarden een golflengte waarop ONP goed absorbeert.
- Maak voor beide pH-waarden een reeks van 6 cuvetten met oplopende concentratie ONP, van 0–0.2 mM. Twee van deze cuvetten heb je uiteraard al gemaakt (de maximale en de minimale concentratie). Bedenk zelf geschikte waarden voor de overige vier concentraties, bereken hoeveel buffer en hoeveel ONP je nodig hebt voor iedere cuvet. Maak eerst een pipetteerschema, en maak vervolgens de twee concentratie-reeksen.
- Meet de extinctie van beide reeksen, en noteer de extinctiewaarden. Een handleiding voor de spectrofotometers is beschikbaar op de practicumzaal.
- Maak met behulp van grafiekpapier of Excel een ijklijn, door de concentraties ONP in de cuvetten (x-as) uit te zetten tegen de gemeten extinctie-waarden.
- Pipetteer 3 ml van de oplossingen met onbekende concentratie ONP in cuvetten, en meet de extinctie-waarden. Noteer deze waarden.

Als laatste bepalen we het absorptie-spectrum van cytochroom c in water, in het golflengtegebied van 480-630 nm. Dit doen we voor zowel de geoxideerde als de gereduceerde vorm van het eiwit.

- Pipetteer 2 ml cytochroom c oplossing in een cuvet.
- Maak een nieuwe blanco-cuvet, met alleen water.
- Meet de blanco als referentie, en meet het absorptiespectrum van cytochroom c.
- Voeg een spatelpunt natriumdithioniet aan beide cuvetten toe, en schud voorzichtig met behulp van parafilm totdat het zout volledig is opgelost.
- Meet opnieuw de referentie en het absorptiespectrum.
- Kopieer de absorptiegegevens naar een spreadsheet, en sla deze op onder je groepsnaam.

Uitwerking

- Bepaal de concentraties ONP in de onbekende oplossingen, met behulp van de extincties en de gemaakte ijklijnen.
- Wat zijn de millimolaire extinctiecoëfficiënten van ONP bij pH 7.0 en 10.5, bij de gemeten golflengtes? Bereken deze waarden (ϵ_{mM} , in $\text{mmol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$) aan de hand van de ijklijnen.
- Bepaal nogmaals de concentraties ONP in de onbekende oplossingen, maar nu met behulp van de berekende extinctiecoëfficiënten en de wet van Lambert-Beer. Komen de concentraties overeen met de eerder bepaalde waarden?
- Maak (als je dit nog niet gedaan hebt) grafieken van alle gemeten absorptiespectra, door de golflengte (x-as) uit te zetten tegen de gemeten extinctie-waarden (y-as). Vergeet niet om eenheden te vermelden bij de assen.
- Zorg dat alle resultaten genoteerd zijn in het labjournaal, en voeg de grafieken erbij.

1.5 Vragen

1. Voldoet de ijklijn die je hebt gemaakt voor ONP volledig aan de wet van Lambert-Beer? Waarom wel/niet?
2. Verklaar aan de hand van het absorptiespectrum waarom ONP in oplossing geel is.
3. Stel je wilt de activiteit (reactiesnelheid) van het menselijke enzym lactase meten. Lactase behoort tot de familie van β -galactosidase enzymen, en is nodig om melkzuur af te breken tot glucose. Het is ook in staat om de synthetische verbinding *ortho-nitrophenol- β -galactoside* (ONPG, zie proef 2) te splitsen in ONP en β -galactose. Het enzym functioneert optimaal bij een neutrale pH. Hoe zou je te werk gaan om de omzettingssnelheid van het enzym te meten?
4. Stel je hebt cytochroom c geïsoleerd uit cellen (bijvoorbeeld met behulp van centrifugatie gevolgd door gelfiltratie, zie proef 3 en 4). Hoe zou je te werk gaan als je de concentratie cytochroom c wilt bepalen in de verkregen oplossing?
5. Wat is het effect van pH op het absorptiespectrum van ONP? Kun je dit verklaren aan de hand van figuur 1.10, en de tekst bij figuur 1.5 en 1.6?
6. De *heem c* groep in cytochroom c accepteert elektronen van een soortgelijke heem-groep in het bc_1 complex, en draagt deze over aan een Cu_A koper-centrum in cytochroom c oxidase. Bestudeer de structuur van *heem c* in figuur 1.12. Kun je verklaren waarom de heem-groep in cytochroom c makkelijk fotonen absorbeert, en dus gekleurd is in oplossing? Wat heeft dit te maken met het feit dat de heem-groepen ook makkelijk elektronen overdragen?
7. Wat is het effect van reductie op het absorptiespectrum van cytochroom c? Kun je dit verklaren?

1.6 Referenties

Voet, Voet & Pratt, 'Fundamentals of Biochemistry', Section 18-2A (The Interaction of Light and Matter), Section 5-2A (General Approach to Purifying Proteins), Chapter 17 (Electron Transport and Oxidative Phosphorylation), Chapter 18 (Phyotsynthesis).

2. Enzymkinetiek

2.1 Inleiding

Biologische systemen worden vrijwel geheel aangedreven door chemische reacties. Daarom is het in alle gebieden van de biologie en medische wetenschappen belangrijk om niet alleen *kwalitatief* iets over die reacties te weten (bv. welke reacties zijn het en hoe hangen ze samen?), maar ook om *kwantitatief* te kunnen rekenen aan dergelijke chemische reacties (bv. hoe snel verlopen ze?). Dit is echter niet mogelijk zonder de hulp van wiskundige *modellen* van chemische processen. In deze proef maken we kennis met eenvoudige wiskundige modellen voor reacties. We gaan we aan de slag met het nog steeds veel gebruikte *Michaelis-Menten model* voor de *kinetiek* (snelheid) van enzymreacties. We bepalen de reactiesnelheid van het enzym *β -galactosidase*, en schatten daarmee de parameters van het model. We kijken ook naar de invloed en het werkingsmechanisme van verschillende typen reversibele enzymremmers, en bepalen het mechanisme en de mate van remming van de stof IPTG.

2.2 Achtergrond en theorie

Enzymen en remmers

Het overgrote deel van de chemische reacties in levende cellen kan niet plaats vinden zonder hulp van *enzymen*. Deze (vaak complexe) eiwitten dienen als katalysatoren in de reactie-ketens die de cel aandrijven en in stand houden. De werking van katalysatoren berust op het feit dat ze de activeringsenergie van een reactie verlagen, zodat deze kan plaatsvinden bij bijvoorbeeld een lagere temperatuur dan gewoonlijk. Enzymen doen dit meestal door te binden aan het *substraat* of de *substraten* (de stoffen die reageren), en zo de vorming van *producten* "een handje te helpen". In cellen worden dergelijke reacties vaak gereguleerd op gen-niveau (bijvoorbeeld door de aanmaak van enzymen te bevorderen of te remmen), maar soms ook door *remming* van enzymreacties. *Remmers* of *inhibitors* zijn stoffen die de snelheid van een enzymreactie verlagen, meestal door te binden aan het enzym.

Reactiekinetiek

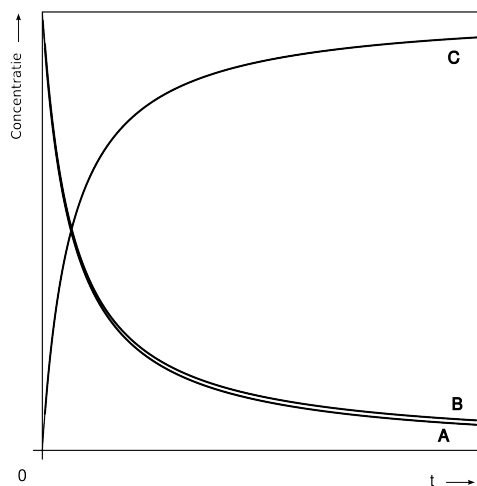
Reactiekinetiek is de tak van chemie die de snelheid van chemische reacties beschrijft. Zoals bekend is de snelheid van een reactie onder meer afhankelijk van temperatuur, druk en concentraties van de reactanten. De invloed van temperatuur, druk en concentratie is te begrijpen aan de hand van wat men wel "*The Law of Mass-Action*" noemt. Voor stoffen in een oplossing of in gasvorm kun je je voorstellen dat de reactiesnelheid afhangt van het aantal *effectieve ontmoetingen* tussen rondvliegende of rondzwevende moleculen in een bepaalde hoeveelheid tijd. Het aantal effectieve ontmoetingen (de "*Action*") per tijdseenheid zal toenemen naarmate het aantal deeltjes (de "*Mass*") in een gegeven volume groter is. Dat wil dus zeggen, een hogere concentratie bij oplossingen, of een hogere druk bij gassen. Het aantal ontmoetingen neemt ook toe bij een hogere snelheid van de moleculen, oftewel een hogere temperatuur. We kunnen dus stellen dat de snelheid van een reactie evenredig is met de *kans* dat de moleculen van de reactanten elkaar ontmoeten. En deze kans neemt weer evenredig toe met concentratie, druk en temperatuur.

Voor de reactie $A + B \rightarrow C$ kunnen we de reactiesnelheid v schrijven als: $v = [A] \cdot [B] \cdot k$,

waarbij de invloeden van temperatuur, druk, etc. verrekend worden in k , de zogenaamde *snelheidsconstante*. Als je bovenstaande vergelijking leest als een kansberekening (van de ontmoeting tussen moleculen), dan staat er dus dat deze kans afhankelijk is van het aantal moleculen van stof **A** in de oplossing, **EN** het aantal moleculen van stof **B** in de oplossing, **EN** de temperatuur, druk, etc. Vandaar dat we de termen vermenigvuldigen in plaats van optellen.

Twee belangrijke dingen vallen op aan bovenstaande uitdrukking voor de reactiesnelheid. Ten eerste gaat deze manier van schrijven er vanuit dat temperatuur, druk, etc. constant zijn, en dat de stoffen perfect gemengd zijn. Als de stoffen niet goed gemengd zijn (denk bijvoorbeeld aan vaste stoffen, maar ook aan de situatie in levende cellen!), dan gaat dit verhaal over ontmoetingskansen niet helemaal meer op. En als we de temperatuur etc. zouden veranderen, dan zou ook de snelheidsconstante k veranderen. Dat is ook een van de voornaamste redenen waarom we stoffen voor een experiment eerst oplossen en netjes mengen (nog afgezien van het feit dat het experiment anders wel erg lang zou gaan duren), en onze proeven uitvoeren bij gelijk blijvende omstandigheden. Dit betekent echter ook dat de resultaten van een experiment (*in vitro*) niet in alle gevallen overeen zullen komen met de processen "in het echt" (*in vivo*). Helaas is dit vaak het geval als je processen in levende organismes bestudeert, let daar dus altijd goed op bij het ontwerpen van een experiment.

Ten tweede kun het aan bovenstaande uitdrukking al zien dat de snelheid niet constant zal zijn. Snelheid is namelijk afhankelijk van concentratie, en de concentraties zullen veranderen naarmate de reactie vordert. Naarmate stof **A** en **B** op raken zal de snelheid van de reactie afnemen. Dit kun je goed zien in figuur 1, dat de concentraties van de stoffen weergeeft in de tijd. Hoe steiler de lijnen, hoe sneller de concentraties veranderen, en hoe sneller de reactie dus verloopt. Met andere woorden, de reactiesnelheid is de helling, en dus de *afgeleide* van de concentratie over de tijd.



Figuur 2.1 Concentraties van de stoffen A, B en C in de tijd, bij de reactie $A + B \rightarrow C$.

Wiskundige modellen

Wiskundig kunnen we de reactiesnelheid van bovenstaande reactie ook opschrijven als:

$$\frac{dC}{dt} = A \cdot B \cdot k, \text{ waarbij } A, B \text{ en } C \text{ de concentraties zijn van de stoffen } \mathbf{A}, \mathbf{B} \text{ en } \mathbf{C}.$$

Chemisch gezien betekent $\frac{dC}{dt}$ de concentratieverandering van het *product*, stof **C**, in de tijd. Dit

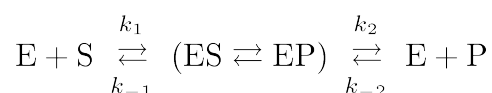
is dus een logische maat voor de snelheid van de reactie. Wiskundig gezien is $\frac{dC}{dt}$ een *differentiaal* (de verandering in C over een oneindig kleine tijd, ofwel de afgeleide van C). Dit type vergelijking is een *differentiaalvergelijking*. Differentiaalvergelijkingen zijn dus erg geschikt als *wiskundig model* van chemische reacties, je komt ze dan ook heel veel tegen in de levenswetenschappen en daarbuiten. Het type differentiaalvergelijking dat we nu zullen gebruiken heet een *ODE (Ordinary Differential Equation)*. Als we de hele reactie willen beschrijven, kunnen we een *stelsel van differentiaalvergelijkingen* opstellen voor de reactiesnelheid van alle stoffen:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= -A \cdot B \cdot k \\ \frac{dB}{dt} &= -A \cdot B \cdot k \\ \frac{dC}{dt} &= A \cdot B \cdot k\end{aligned}$$

Dat ziet er in dit geval niet zo spannend uit, maar bij evenwichten en gekoppelde reacties wordt het natuurlijk al snel ingewikkelder. Het oplossen van ODE's is meestal geen eenvoudige kwestie, en vaak zelfs helemaal niet mogelijk. Maar bovenstaande vergelijkingen kunnen we, samen met k en beginwaarden voor A , B en C invoeren in een computer. Deze kan dan simpelweg de afgeleides berekenen voor kleine stapjes van t , nieuwe waarden voor A , B en C berekenen en invullen, enzovoort. Dit noemen we het *integreren* van een stelsel van ODE's, en zo is ook figuur 1 gemaakt. Je kunt het zien als een computersimulatie van een (goed gemengde) chemische reactie. Dergelijke vergelijkingen worden echter ook veel gebruikt om andere processen te modelleren, zoals populaties in de ecologie en ziektes in de epidemiologie.

Een eenvoudige enzymreactie

Een "prototype" enzymreactie zou er zo uit kunnen zien:



Het enzym **E** bindt aan het *substraat S* en vormt een *enzym-substraatcomplex ES*, dat wordt omgezet in een enzym-productcomplex **EP**, en vervolgens weer *dissocieert* tot vrij enzym en een *product P*. Het substraat en het product kunnen uiteraard ook meerdere stoffen zijn. Voor het gemak zullen we in deze tekst verder de **ES**-term gebruiken voor het enzym-substraatcomplex en het enzym-productcomplex samen, aangezien deze meestal relatief snel in elkaar worden omgezet.

De "mass-action" snelheden van de vier deelreacties worden gegeven door de concentraties van de stoffen en de snelheidsconstanten voor iedere reactie:

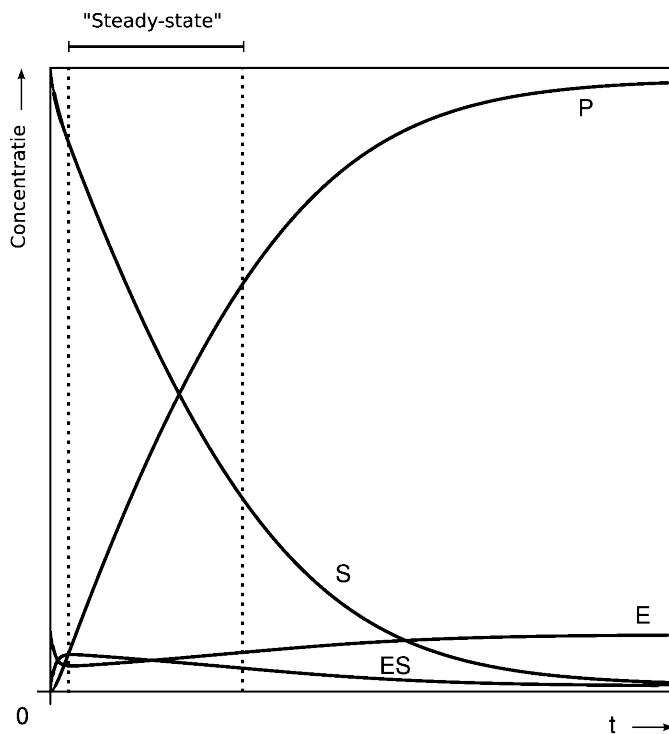
$$\begin{aligned}v_1 &= E \cdot S \cdot k_1 \\ v_{-1} &= ES \cdot k_{-1} \\ v_2 &= ES \cdot k_2 \\ v_{-2} &= E \cdot P \cdot k_{-2}\end{aligned}$$

De vorming en afbraak van alle stoffen in deze reactie kunnen we vervolgens modelleren met

het volgende stelsel van ODE's:

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -v_1 + v_{-1} = -E \cdot S \cdot k_1 + ES \cdot k_{-1} \\ \frac{dE}{dt} &= -v_1 + v_{-1} + v_2 - v_{-2} = -E \cdot S \cdot k_1 + ES \cdot k_{-1} + ES \cdot k_2 - E \cdot P \cdot k_{-2} \\ \frac{dES}{dt} &= v_1 - v_{-1} - v_2 + v_{-2} = E \cdot S \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 + E \cdot P \cdot k_{-2} \\ \frac{dP}{dt} &= v_2 - v_{-2} = ES \cdot k_2 - E \cdot P \cdot k_{-2} \end{aligned} \quad (1)$$

Reacties waarbij een stof verdwijnt schrijven we als een negatieve term in de vergelijking (de concentratieverandering is immers negatief), reacties waarbij stoffen gevormd worden schrijven we als een positieve term. Het integreren van deze ODE's leidt tot de volgende grafiek voor het verloop van de concentraties in de tijd:



Figuur 2.2 Het verloop van de concentraties substraat (S), product (P), enzym (E) en enzym-substraat complex (ES) in de tijd, bij een eenvoudige enzymreactie.

Michaelis-Menten

In 1894 postuleerde de Duitse chemicus Emil Fischer in *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme* voor het eerst het mechanisme dat we nu kennen voor de werking van enzymen, waarbij hij enzym en substraat vergeleek met een slot en een sleutel die precies op elkaar passen. Op basis van dit mechanisme publiceerde de Fransman Victor Henri in 1903 een wiskundige beschrijving van de snelheid van een algemene enzymreactie in zijn boek *Lois Générales de l'Action des Diastases*. In 1913, tien jaar later, presenteerden de Canadese pathologe Leonor Michaelis en de Duitse biochemicus Maud Menten een beter uitgewerkte en enigszins vereenvoudigde versie van het model van Henri in hun artikel *Die Kinetik der Invertinwirkung*. Deze *Henri-Michaelis-Menten* vergelijking wordt tot op de dag van vandaag nog veel gebruikt in de levenswetenschappen, al is de huidige afleiding afkomstig van de Britse

biologen George Edward Briggs and John Burdon Sanderson ("JBS") Haldane (in: *A note on the kinetics of enzyme action*, 1925).

Het Henri-Michaelis-Menten model beschrijft de snelheid van een enzymreactie als functie van de concentratie substraat. Het model berust op de hierboven beschreven ODE's, met een aantal extra aannames en vereenvoudigingen.

Zoals al gezegd varieert de snelheid van een reactie met de concentratie van de reactanten, dus de snelheid is nooit constant. Echter, als je goed kijkt naar de helling van de lijnen in *figuur 2*, dan valt op dat de reactiesnelheid aan het begin van de reactie snel stijgt, en daarna enige tijd min of meer hetzelfde blijft. Pas als de reagerende stoffen op raken dan begint de snelheid merkbaar te dalen. We kunnen dus zeggen dat gedurende een groot deel van de reactie de snelheid *bij benadering* constant is, omdat de afname van de reagerende stoffen relatief klein is ten opzichte van de hoeveelheid stof die er nog is. Een dergelijke vereenvoudiging noemen we een *nulde-orde benadering*, en het is een erg nuttige maat als je het wilt hebben over "de" snelheid van een reactie. In het geval van onze enzymreactie, kunnen we zeggen dat de snelheid bij benadering constant is zo lang er voldoende substraat is (en het enzym niet degradeert of afgebroken wordt).

De snelheid is dan uiteraard nog wel afhankelijk van de (begin)concentraties enzym en substraat, en van temperatuur en pH. We verwaarlozen alleen de *afname* van de substraatconcentratie, zo lang deze relatief klein is ten opzichte van de nog overgebleven concentratie. Voor onze vergelijkingen betekent dit dat de concentratie substraat (S) in dit stadium van de reactie nog nauwelijks zal verschillen van de beginconcentratie S_0 .

Zo lang er relatief weinig substraat is omgezet, zal er ook relatief weinig product zijn gevormd. We kunnen dus ook stellen dat terugreactie van product naar enzym-substraatcomplex verwaarloosbaar klein is ten opzichte van de heenreactie, in dit stadium van de reactie. Ofwel, de term voor de snelheid van deze reactie kunnen we verwaarlozen: $v_{-2} = E \cdot P \cdot k_{-2} \approx 0$.

Onze laatste belangrijke vereenvoudiging is een zogenaamde *steady-state aanname*. Deze vereenvoudiging wordt vaak toegepast als de mate van verandering in een bepaald proces veel kleiner is dan de variatie in andere processen die ermee samenhangen. Je kunt in dit geval bijvoorbeeld denken aan een reactieketen waarbij een van de tussenproducten alleen aanwezig is in zeer kleine hoeveelheden (bijvoorbeeld doordat deze snel gevormd en weer afgebroken wordt). Een verandering in concentratie van dit tussenproduct zal dan dus verwaarloosbaar klein zijn ten opzichte van een verandering in een van de andere stoffen, simpelweg omdat er weinig tussenproduct aanwezig is. Voor enzymreacties is dit inderdaad het geval: mits er veel minder enzym aanwezig is dan substraat, zal de concentratie enzym-substraatcomplex veel lager zijn dan de concentraties substraat en product. We kunnen dan ook stellen dat de *verandering* van de concentratie ES nog veel kleiner zal zijn dan de *verandering* in P en S . Dus als er veel meer substraat aanwezig is dan enzym, dan kunnen we bij benadering zeggen: $\frac{dES}{dt} \approx 0$.

Als we bovengenoemde vereenvoudigingen toepassen op de formules van het model in (1), dan krijgen we:

$$\begin{aligned}
 \frac{dS}{dt} &= -v_1 + v_{-1} = -E \cdot S_0 \cdot k_1 + ES \cdot k_{-1} \\
 \frac{dE}{dt} &= -v_1 + v_{-1} + v_2 = -E \cdot S_0 \cdot k_1 + ES \cdot k_{-1} + ES \cdot k_2 \\
 \frac{dES}{dt} &= v_1 - v_{-1} - v_2 = E \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 = 0 \\
 \frac{dP}{dt} &= v_2 = ES \cdot k_2
 \end{aligned} \tag{2}$$

Zoals gezegd beschrijft het Henri-Michaelis-Menten model de snelheid van een enzymreactie als functie van de concentratie substraat. De effectieve snelheid van een enzymreactie is de snelheid waarmee product gevormd wordt: $\frac{dP}{dt} = ES \cdot k_2$. Onder de aannames die we zojuist hebben beschreven, en in een constante omgeving (die de waarde van k_2 bepaalt), is deze snelheid afhankelijk van de complexconcentratie ES . We hebben gesteld dat de verandering in deze concentratie relatief klein is, zodat $\frac{dES}{dt} = 0$ en de differentiaalvergelijking voor $\frac{dES}{dt}$ uit het model in (2) geschreven kan worden als een "gewone" vergelijking met twee variabelen (E en ES) en vier constantes (S_0 , k_1 , k_{-1} en k_2):

$$E \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 = 0 \tag{3}$$

We kunnen de variabele voor enzymconcentratie (E) schrijven als een constante, door gebruik te maken van de *wet van behoud van massa*. Aangezien we aannemen dat er geen enzym verdwijnt, zal de totale concentratie enzym plus enzym-substraatcomplex, E_t gelijk blijven:

$$E_t = E + ES, \text{ en dus ook: } E = E_t - ES. \tag{4}$$

Dit laatste kunnen we invullen in vergelijking (3):

$$(E_t - ES) \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 = 0 \tag{5}$$

Vervolgens kunnen we ES vrijmaken:

$$\begin{aligned}
 E_t \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 &= 0 \\
 -ES \cdot S_0 \cdot k_1 - ES \cdot k_{-1} - ES \cdot k_2 &= -E_t \cdot S_0 \cdot k_1 \\
 -ES \cdot (S_0 \cdot k_1 + k_{-1} + k_2) &= -E_t \cdot S_0 \cdot k_1 \\
 ES &= \frac{E_t \cdot S_0 \cdot k_1}{S_0 \cdot k_1 + k_{-1} + k_2}
 \end{aligned}$$

Als we nu teller en noemer delen door $S_0 \cdot k_1$, dan kunnen we alle snelheidsconstanten schrijven als één enkele breuk. En om de vergelijking wat overzichtelijker te maken kunnen we vervolgens deze breuk van constanten schrijven als een nieuwe constante, K_m :

$$ES = \frac{E_t}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{S_0 \cdot k_1}}$$

$$ES = \frac{E_t}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{1}{S_0}}$$

$$ES = \frac{E_t}{1 + K_m \cdot \frac{1}{S_0}}$$

De constante K_m wordt vaak de *Michaelis-Menten constante* genoemd. Let wel op dat deze constante een combinatie is van snelheidsconstanten, en dus afhankelijk is van de precieze reacties en de omgevingsfactoren. De constante moet daarom per geval experimenteel bepaald worden.

De uitdrukking voor ES die we nu verkregen hebben, kunnen we invullen in de vergelijking voor de vorming van het product:

$$\frac{dP}{dt} = ES \cdot k_2 = \frac{E_t}{1 + K_m \cdot \frac{1}{S_0}} \cdot k_2 = \frac{E_t \cdot k_2}{1 + \frac{K_m}{S_0}}$$

Dit is de Henri-Michaelis-Menten vergelijking voor de snelheid van een enzymreactie als functie van de hoeveelheid substraat, S_0 . De term $E_t \cdot k_2$ wordt meestal geschreven als V_{max} , omdat het een uitdrukking is voor de snelheid van de reactie als het enzym verzadigd is met substraat. In dat geval is al het enzym gebonden als enzym-substraatcomplex. Toevoeging van extra substraat zal de reactiesnelheid dan niet verder doen stijgen, want er is geen vrij enzym meer om aan te binden. In dat geval geldt $ES = E_t$, en dus $\frac{dP}{dt} = ES \cdot k_2 = E_t \cdot k_2 = V_{max}$.

De Henri-Michaelis-Menten vergelijking geldt uiteraard alleen in gevallen waarin aan alle aannames redelijkerwijs wordt voldaan:

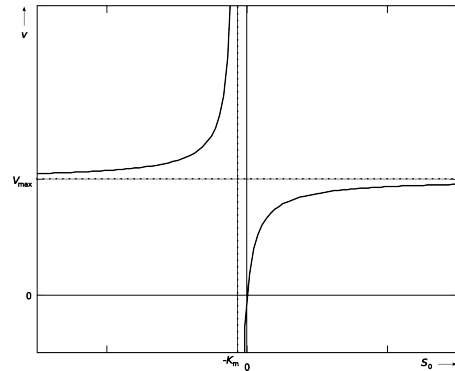
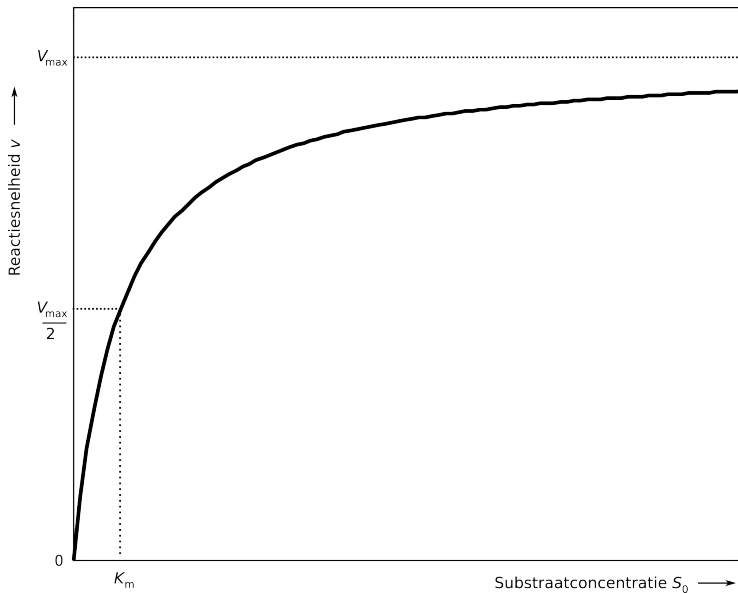
- De reactiesnelheid moet bij benadering constant zijn. Dit is het geval aan het begin van de reactie (zo lang de substraatconcentratie niet beperkend wordt), of in evenwichts-situaties waarbij verdwenen substraat direct weer wordt aangevuld (*steady state* voor S).
- Er moet (veel) meer substraat aanwezig zijn dan product, zodat we de terugreactie van product naar complex kunnen verwaarlozen. Ook dit is het geval aan het begin van de reactie, of in situaties waarbij gevormd product direct wordt afgevoerd.
- Er moet (veel) meer substraat aanwezig zijn dan enzym, zodat de verandering in de concentratie ES verwaarloosd kan worden (*steady state aanname* voor ES).
- De overige omgevingsfactoren, zoals temperatuur, druk en pH moeten constant zijn, anders veranderen de waardes van K_m en V_{max} .
- De reactie moet plaatsvinden in een redelijk homogeen medium.

Veel enzymreacties voldoen bij benadering aan deze voorwaarden (we spreken in dat geval van “Michaelis-Menten kinetiek”). De vergelijking wordt dus nog erg veel gebruikt, meestal in de vorm:

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{S_0}} \quad \text{of} \quad v = \frac{V_{max} \cdot S_0}{K_m + S_0} \quad (6)$$

De tweede variant is gelijk aan de eerste, alleen zijn teller en noemer hier beiden vermenigvuldigd met S_0 .

Wiskundig gezien is dit een functie van de vorm $y = \frac{a \cdot x}{b+x}$, ofwel een breukfunctie. De bijbehorende grafiek is een hyperbool met een horizontale asymptoot bij V_{max} en een verticale asymptoot bij $-K_m$.



Figuur 2.3 De Michaelis-Menten curve (links) geeft het verband tussen reactiesnelheid en substraatconcentratie, en is de uitkomst van de Henri-Michaelis-Menten vergelijking. Wiskundig gezien is de vergelijking een breukfunctie en de grafiek dus een hyperbool (boven), waarvan we gewoonlijk uiteraard alleen het positieve deel tekenen.

Biologisch en chemisch gezien laat deze grafiek zien dat de snelheid van een enzymreactie toeneemt naarmate je meer substraat toevoegt. Echter, deze toename wordt steeds minder naarmate je substraat blijft toevoegen en het enzym verzadigd raakt. De Henri-Michaelis-Menten vergelijking beschrijft dus een *verzadigingsproces*. Daarom wordt dit type vergelijking niet alleen gebruikt voor enzymreacties, maar ook om allerlei andere verzadigingsprocessen te modelleren. In de ecologie wordt bijvoorbeeld exact dezelfde soort vergelijking gebruikt om te beschrijven hoeveel prooien een roofdier maximaal kan eten binnen een bepaalde tijd.

Fitten van parameters

In biochemische experimenten kan de Henri-Michaelis-Menten vergelijking gebruikt worden voor het berekenen van reactiesnelheden bij verschillende substraatconcentraties, mits V_{max} en K_m bekend zijn (voor een gegeven enzymconcentratie en onder gegeven omstandigheden). Deze twee *parameters* worden daarom meestal eerst experimenteel bepaald door het meten van de reactiesnelheid bij een aantal substraatconcentraties. Als je deze meetwaarden tegen elkaar uitzet dan kun je met behulp van een computer de waarden van V_{max} en K_m vinden waarvoor de bijbehorende grafiek goed door de meetpunten loopt. Deze procedure noemen we het *fitten* van de parameters door middel van *niet-lineaire regressie*.

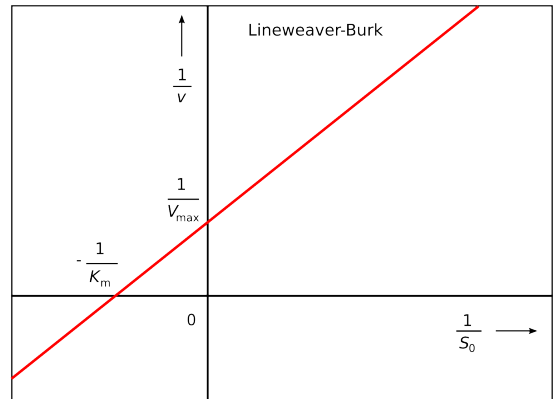
Het is echter pas sinds enkele decennia dat computers beschikbaar zijn voor biochemisch onderzoek. Voor die tijd was niet-lineaire regressie vrijwel onmogelijk uit te voeren, en waren dus andere methodes nodig om de waarden van V_{max} en K_m te bepalen. Meestal werden de meetwaarden via een eenvoudige wiskundige bewerking dusdanig *getransformeerd* dat ze op een rechte lijn zouden moeten vallen. Uit de snijpunten van de best-passende lijn door de meetpunten met de "getransformeerde" assen kunnen dan de waarden van de parameters

afgelezen worden (*lineaire regressie*). Dergelijke *lineaire transformatie* methodes wordt nog steeds veel gebruikt.

De meest gebruikte methode is de *Lineweaver-Burk* transformatie. Deze houdt in dat simpelweg de *dubbele reciproke* genomen wordt van de Henri-Michaelis-Menten vergelijking, in andere woorden men neemt 1 gedeeld door beide zijden van de vergelijking (en dus beide assen). Aangezien het een breukfunctie betreft, en delen door een breuk gelijk staat aan vermenigvuldigen met het omgekeerde, zal de uitkomst in dit geval een lineaire functie zijn van de vorm $y = b + a \cdot x$:

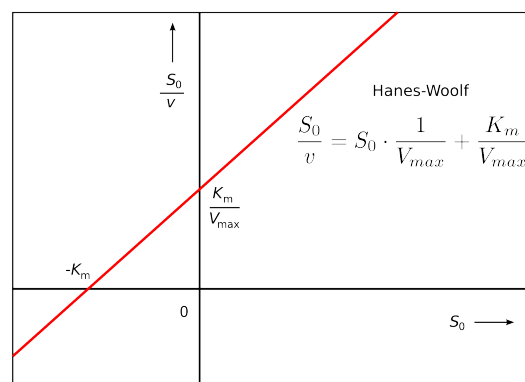
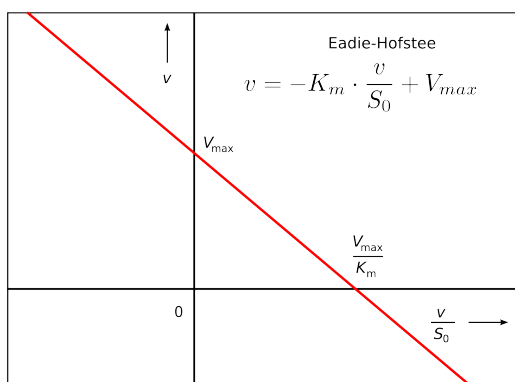
$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{S_0}} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{K_m}{S_0}}{V_{max}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S_0}$$

In de praktijk betekent dit het volgende: als je niet de reactiesnelheid v tegen de substraatconcentratie S_0 uit zet, maar $\frac{1}{v}$ tegen $\frac{1}{S_0}$, dan zouden de meetpunten op een rechte lijn moeten vallen, met als functie $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S_0}$. Het snijpunt van deze lijn met de $\frac{1}{v}$ -as is $\frac{1}{V_{max}}$, en het snijpunt met de $\frac{1}{S_0}$ -as is $-\frac{1}{K_m}$. Hieruit kun je eenvoudig de



waarden van V_{max} en K_m berekenen. Het nadeel van deze methode is echter dat je met de meetwaarden tevens de meetfout transformeert. De laagste waarden, met relatief de grootste onzekerheid, worden "opgeblazen". Zij leveren daardoor de hoogste waarden op in de Lineweaver-Burk grafiek, en vice versa. Met andere woorden, de Lineweaver-Burk transformatie versterkt de invloed van meetfouten. Wees hier bedacht op bij het toepassen of interpreteren van deze methode.

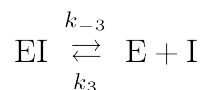
Naast Lineweaver-Burk zijn er nog twee veel gebruikte lineaire transformaties, *Eadie-Hofstee* en *Hanes-Woolf*. Deze hebben minder last van de statistische problemen van Lineweaver-Burk. De bijbehorende functies en grafieken zijn hieronder weergegeven. In de praktijk worden dergelijke lineaire transformaties echter vooral voor grafische representatie en voor het vergelijken van gegevens gebruikt, en niet meer om parameters te schatten.



Remmers

Remmers of inhibitors zijn stoffen die de activiteit van een enzym verlagen door te binden aan het enzym. Metabolische routes in cellen worden vaak voor een deel gereguleerd door remmers, en de werking van veel geneesmiddelen en pesticiden berust ook op remming van een bepaald enzym. Er zijn grofweg twee verschillende typen remming: reversibel en niet-reversibel. Niet-reversibele remmers binden meestal aan het enzym, waardoor de structuur verandert en het enzym inactief wordt of de activiteit vermindert. Reversibele remmers binden in een evenwicht aan het enzym zonder de structuur te veranderen. Het effect van reversibele remming op de reactiesnelheid hangt af van of een remmer bindt aan vrij enzym (*competitive inhibition*), aan enzym-substraatcomplex (*uncompetitive inhibition*) of aan beiden (*mixed inhibition* of *non-competitive inhibition*).

In het geval van *competitive inhibition* concurreert de remmer met het substraat om binding aan het vrije enzym. Hierdoor kan er minder substraat binden aan enzym, en gaat de reactiesnelheid omlaag. Echter, bij toevoeging van voldoende substraat zal de "concurrentiepositie" van het substraat wel beter worden. Dit kunnen we modelleren door twee extra snelheidsvergelijkingen op te stellen voor de binding van de remmer **I** aan het vrije enzym **E**. Maar we zullen het hier eenvoudiger doen, door de invloed van de remmer in het model te verwerken aan de hand van de *dissociatieconstante* K_d (de evenwichtsconstante voor de dissociatie van het enzym-remmer-complex) en de totale hoeveelheid enzym E_t .



$$K_d^{EI} = \frac{I \cdot E}{EI} \Rightarrow EI = \frac{I \cdot E}{K_d^{EI}} \quad \text{en}$$

$$E_t = E + ES + EI = E + ES + \frac{I \cdot E}{K_d^{EI}} = E \cdot \underbrace{\left(1 + \frac{I_0}{K_d^{EI}}\right)}_{Z_i^E} + ES$$

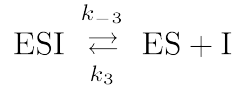
Net als voor de substraatconcentratie gaan we hier uit van een steady-state evenwicht ($\frac{dEI}{dt} \approx 0$), en nemen we aan dat er aan er veel meer remmer aanwezig is dan product en enzym, zodat de afname van de hoeveelheid remmer daarom te verwaarlozen is (en dus $I \approx I_0$). Als we een nieuwe constante $Z_i^E = \frac{I_0}{K_d^{EI}}$ introduceren, vergelijking (4) vervangen door $E_t = E \cdot Z_i^E + ES \Rightarrow E = \frac{E_t - ES}{Z_i^E}$ en vervolgens opnieuw de Henri-Michaelis-Menten vergelijking afleiden, dan krijgen we een "geremde" variant van de originele vergelijking (6):

$$v_i^E = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m \cdot Z_i^E}{S_0}} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m'}{S_0}} \quad (7)$$

Het model in aanwezigheid van een remmer heeft dus in feite alleen een nieuwe K_m' , die gelijk is aan de K_m in afwezigheid van de remmer, vermenigvuldigd met de factor Z_i^E . Deze factor kun je zien als een maat voor de hoeveelheid remming: Z_i^E neemt toe met de concentratie remmer I_0 , en neemt af bij een grotere dissociatieconstante K_d (aangezien het enzym-remmer complex dan makkelijker dissocieert).

Het Henri-Michaelis-Menten model kan dus gebruikt worden om enzymremming te herkennen, als de parameters K_m en V_{max} bepaald worden voor de situaties met en zonder remmer. *Competitive inhibition* is vervolgens te herkennen aan het feit dat het de waarde van K_m verhoogt, zonder de waarde van V_{max} te beïnvloeden.

Bij *uncompetitive inhibition* bindt de remmer enkel aan het enzym-substraatcomplex, waardoor het complex zijn catalytische functie niet meer kan uitoefenen. Aangezien het substraat in dit geval niet concurreert met de remmer, zal toevoeging van extra substraat de situatie niet verbeteren. Dit type remming is vrij zeldzaam. We kunnen het op dezelfde manier modelleren als bij *competitive inhibition*:



$$K_d^{ESI} = \frac{I \cdot ES}{ESI} \Rightarrow ESI = \frac{I \cdot ES}{K_d^{ESI}} \quad \text{en}$$

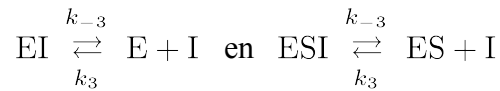
$$E_t = E + ES + ESI = E + ES + \frac{I \cdot ES}{K_d^{ESI}} = ES \cdot \underbrace{\left(1 + \frac{I_0}{K_d^{ESI}}\right)}_{Z_i^{ES}} + E$$

Opnieuw afleiden van de Henri-Michaelis-Menten vergelijking geeft dan:

$$v_i^{ES} = \frac{V_{max}}{Z_i^{ES} + \frac{K_m}{S_0}} = \frac{V_{max}/Z_i^{ES}}{1 + \frac{K_m/Z_i^{ES}}{S_0}} = \frac{V'_{max}}{1 + \frac{K'_m}{S_0}} \quad (8)$$

Uncompetitive inhibition zal dus de waardes van zowel K_m als V_{max} verlagen met dezelfde factor.

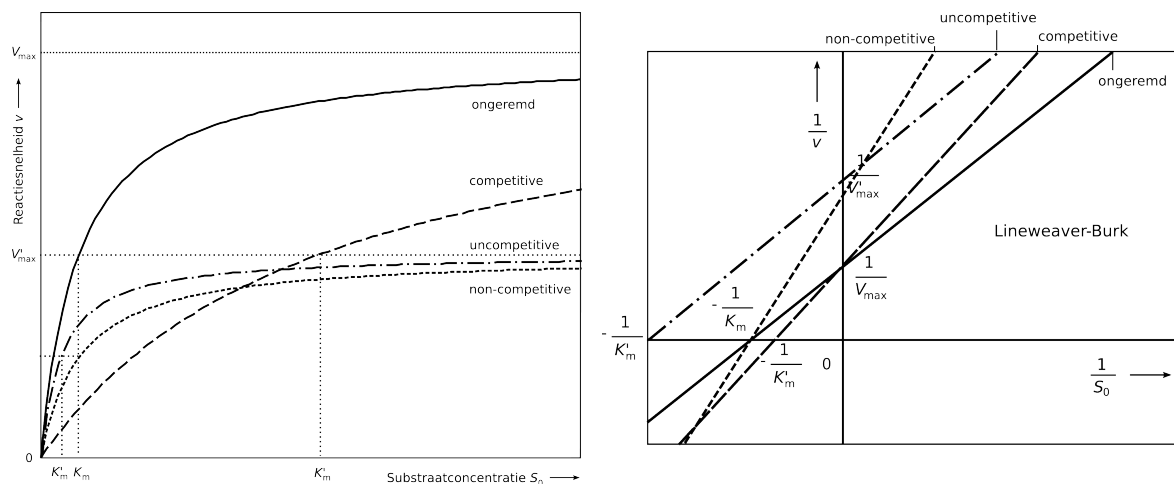
Bij *mixed inhibition* bindt de remmer aan zowel vrij als gebonden enzym. *Non-competitive inhibition* is een speciaal geval hiervan, waarbij de evenwichtsconstante (en snelheidsconstante) hetzelfde is, ongeacht of het enzym vrij of gebonden is. De uitkomst is dus een combinatie van vergelijking (7) en (8):



$$K_d^{ES} = K_d^{ESI} \quad \text{en} \quad Z_i^E = Z_i^{ES} = Z_i$$

$$v_i = \frac{V_{max}}{Z_i + \frac{K_m \cdot Z_i}{S_0}} = \frac{V_{max}/Z_i}{1 + \frac{K_m}{S_0}} = \frac{V'_{max}}{1 + \frac{K'_m}{S_0}} \quad (9)$$

Non-competitive inhibition is dus te herkennen aan het feit dat het enkel de waarde van V_{max} verlaagt. *Mixed inhibition* zal echter de waardes van zowel V_{max} als K_m beïnvloeden, omdat de evenwichts- en snelheidsconstanten van binding met vrij en gebonden enzym in dit geval verschillend zijn. *Mixed inhibition* is dus soms lastig te onderscheiden van de overige typen remming door alleen de waardes van K_m en V_{max} te meten, aangezien er altijd een meetfout is.



2.3 Over de proef

In deze proef gaan we de reactiesnelheid van een enzymreactie meten bij verschillende substraatconcentraties. Aan de hand daarvan zullen we een Michaelis-Menten curve maken en de waarden van de parameters K_m en V_{max} voor deze reactie bepalen. We doen dit voor zowel een normale reactie als een reactie in de aanwezigheid van een remmer. Door de waarden van de parameters te vergelijken kunnen we vaststellen met welk type (reversibele) remmer we te maken hebben. Bovendien kunnen we aan de hand daarvan de dissociatieconstante van de remmer schatten.

De reactie die we gebruiken is de splitsing (hydrolyse) van *ortho-nitrophenyl-β-galactoside* (ONPG) in *ortho-nitrophenol* (ONP, zie proef 1) en *galactose*: $\text{ONPG} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ONP} + \text{G}$. Deze reactie wordt gekatalyseerd door enzymen van de *β-galactosidase*-familie.

De *β-galactosidasen* zijn een familie van belangrijke hydrolase enzymen die in staat zijn om een *β-galactoside* brug te verbreken, en waartoe onder meer het bekende enzym *lactase* behoort. *Lactase* splitst *disaccharide-lactose* (aanwezig in melkproducten) in *galactose* en *glucose*. Een afname in de activiteit van *lactase* na het tweede levensjaar veroorzaakt lactose-intolerantie bij de meeste mensen. Een mutatie ongeveer 6 millennia geleden, heeft ervoor gezorgd dat Noord-Afrikanen, Europeanen (en hun afstammelingen in Amerika en Australië) langer *lactase* aan blijven maken. Daaraan hebben we te danken dat de meeste Nederlanders hun hele leven melkproducten kunnen blijven eten en drinken.

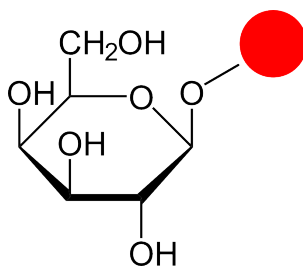
We gebruiken voor deze proef het *β-galactosidase* enzym uit *Escherichia coli* bacteriën, dat wordt gecodeerd door het *lacZ*-gen*. Deze reactie wordt veel gebruikt om genetisch gemodificeerde organismes, waarbij het *lacZ* gen wordt ingebouwd als reporter-gen. Met de beschreven hydrolyse-reactie van ONPG kunnen organismes vervolgens geselecteerd worden, en kan de expressie van andere genen gemeten worden. (Een ander veelgebruikt reporter-gen is het gen dat codeert voor het fluorescente eiwit GFP, dat gebruikt wordt in proef 5 en 6.)

* Zie bijvoorbeeld PDB (www.pdb.org, ID's: 1jyv en 1jyx) en de NCBI Entrez Protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, ID: P00722) voor meer informatie over de structuur en genetica van dit enzym.

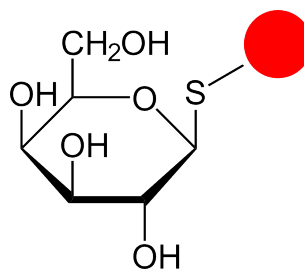
Thiogalactosides zijn verbindingen die een zwavelatoom in plaats van een zuurstofatoom hebben in de β -galactoside brug, en die daardoor ongevoelig zijn voor afbraak door β -galactosidase enzymen. Ze worden echter wel gebonden door het enzym, en kunnen dus fungeren als remmer. De remmer die we in de proef gebruiken, *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) is een thiogalactoside. Interessant genoeg kan deze verbinding juist gebruikt worden als *inductor* om de aanmaak van β -galactosidase te bevorderen in *E. coli*. Het mechanisme dat deze aanmaak reguleert (en waartoe ook het *lacZ*-gen behoort) heet het *lac*-operon, en is een van meest bestudeerde genetische regulatie-mechanismen.

We meten de snelheid van de enzymreactie aan de hand van de concentratie-toename van één van de producten, ortho-nitrofenol (ONP). De ONPG-oplossing is kleurloos, maar ONP is geel, zoals we gezien hebben in proef 1. We kunnen dus de concentratietoename van ONP meten met een spectrofotometer. We doen dit voor een aantal verschillende beginconcentraties substraat (ONPG), en tekenen een Michaelis-Menten curve door de gemeten vormingssnelheden van ONP uit te zetten tegen de beginconcentraties ONPG.

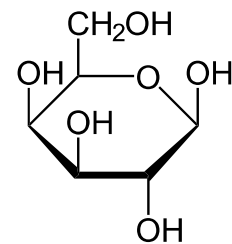
Vanwege de uitgebreide uitwerking van de gegevens bestaat dit practicum uit twee dagdelen. Tijdens het tweede dagdeel zullen we met behulp van Excel de grafieken tekenen, de gemeten snelheden gebruiken om de parameters van het Michaelis-Menten model te fitten, en de remmings-eigenschappen van IPTG onderzoeken.



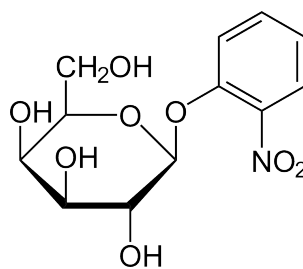
β -galactoside
(met willekeurige zijgroep)



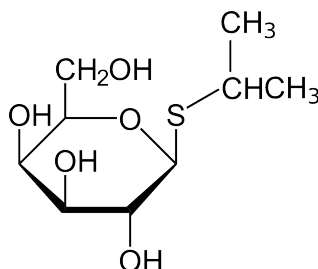
thiogalactoside
(met willekeurige zijgroep)



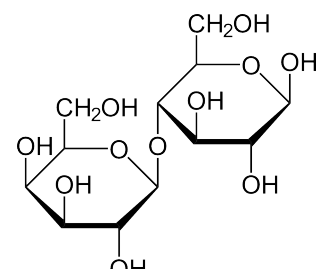
galactose



ortho-nitrophenyl- β -galactoside
(ONPG)



isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
(IPTG)



lactose

2.4 Handleiding

Benodigheden

- 30 ml 0.3 M K/Na-fosfaatbuffer (KNaP buffer), pH 7.0
- 15 ml 1.5 mM ONPG in KNaP-buffer (substraat)
- 10 ml 5 mM IPTG in KNaP-buffer (remmer)
- 0.5 ml β -galactosidase suspensie (enzym, *E. coli* homogenaat) (koud bewaren!)
- cuvetten, pipetten, parafilm, ijs-bak

Werkwijze

We beginnen met het maken van een reeks van 6 cuvetten met een oplopende concentratie substraat (A), en eenzelfde reeks cuvetten (B) waar remmer aan toegevoegd is. Vul de cuvetten als volgt:

Cuvet	KNaP (ml)	ONPG (ml)	IPTG (ml)
A ₁	1.00	2.00	-
A ₂	2.00	1.00	-
A ₃	2.50	0.50	-
A ₄	2.60	0.40	-
A ₅	2.75	0.25	-
A ₆	2.80	0.20	-
B ₁	-	2.00	1.00
B ₂	1.00	1.00	1.00
B ₃	1.50	0.50	1.00
B ₄	1.60	0.40	1.00
B ₅	1.75	0.25	1.00
B ₆	1.80	0.20	1.00

- Maak ook een referentie-cuvet voor de spectrofotometer, met 3.0 ml KNaP-buffer.
- Bepaal met behulp van de gegevens uit proef 1 op welke golflengte je het beste kunt meten. Stel de golflengte in en stel de meter op nul met de referentie-cuvet.

We starten nu per cuvet de hydrolyse-reactie door het enzym toe te voegen. We meten met de computer direct de absorptietoename in de eerste fase van de reactie, en bepalen aan de hand daarvan later de reactiesnelheid. Ga als volgt te werk:

- Pipetteer 10 μ l β -galactosidase suspensie in de vloeistof, homogeniseer met parafilm en sluit het klepje van de spectrofotometer.

- Plaats de meetcuvet in de spectrofotometer en start de meting op de computer.
- Laat de reactie lopen (ongeveer een minuut), totdat een rechte lijn (constante reactiesnelheid) is verkregen waarvan de helling goed bepaald kan worden.
- Vervang de meetcuvet door een volgende meetcuvet, en herhaal de procedure.
- Het is niet noodzakelijk (maar uiteraard wel beter) na elke meting weer opnieuw de blanco in te stellen.
- Als je tussen de cuvetten de meting stopt en start, dan zijn de resultaten beter uit elkaar te houden. Het is ook mogelijk om commentaar toe te voegen bij de meting, dus maak daar gebruik van!

Uitwerking (deel 1)

- Selecteer na de metingen in Chart van iedere lijn een zo groot mogelijk recht stuk, en bepaal hiervan de helling met behulp van de Data Pad. Voeg de helling voor iedere cuvet toe aan de Data Pad, en kopieer de resultaten naar een Excel-werkblad.
- Bereken de concentraties ONPG en IPTG in iedere cuvet, en zet deze concentraties ook in een kolom van het Excel-werkblad. Vergeet niet de betekenis en eenheid van iedere kolom te vermelden, bijvoorbeeld op de eerste regel. Sla het werkblad op in je home-directory.
- Schrijf kort op in je labjournaal wat je hebt gedaan, en waarom. Noteer ook mogelijke problemen of eigenaardigheden die je bent tegengekomen tijdens de proef of de meting, zodat je bij het tweede deel van deze proef (de uitwerking) nog weet welke resultaten betrouwbaar zijn. Laat je labjournaal aan de assistent zien voordat je weggaat.

Uitwerking (deel 2)

- Reken de gemeten vormingssnelheden van ONP om naar $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ met behulp van de wet van Lambert-Beer. Gebruikt de bijpassende millimolaire extinctiecoëfficiënt voor ONP die je hebt bepaald bij proef 1.
- Maak twee Michaelis-Menten plots van je gegevens (met en zonder remmer), door de reactiesnelheden (v , op de y-as) uit te zetten tegen de substraatconcentraties (S_0 , op de x-as). Maak ook Lineweaver-Burk plots, door de reciproke (1 gedeeld door de waarde) van beide variabelen tegen elkaar uit te zetten. Vergeet de eenheden niet te vermelden!
- Schat de waardes van de parameters K_m en V_{max} aan de hand van beide typen grafieken. Komen de waardes ongeveer overeen?
- Kun je aan de hand van deze resultaten al zien met welk type remmer je te maken hebt?
- Bepaal de waardes van K_m en V_{max} met behulp van een niet-lineaire regressie. Hiervoor kunnen we de *Solver*-functie van Excel gebruiken. Een handleiding hiervoor is te vinden op Blackboard.
- Zorg dat alle resultaten genoteerd zijn in het labjournaal. Voeg ook de grafieken toe.

2.5 Vragen

1. Zijn de waarden die je hebt bepaald met regressie ongeveer hetzelfde als de waarden geschat aan de hand van de Michaelis-Menten en de Lineweaver-Burk plots? Zo nee, kun je verklaren waarom niet?
2. Bepaal het type remming door IPTG aan de hand van deze waarden van K_m en V_{max} . Komt dit overeen met wat je weet van de structuur van IPTG vergeleken met ONPG?
3. Bereken de dissociatieconstante(s) van het enzym-remmer-complex aan de hand van de gegevens die je nu hebt.
4. Wat is de betekenis van de dissociatieconstante(s)? Wat is de eenheid?
5. Als je twee keer zo veel IPTG toegevoegd zou hebben aan de cuvetten, wat zou dat invloed hebben op de snelheid waarmee ONPG gehydrolyseerd wordt? Hoe zou je Michaelis-Menten grafiek in aanwezigheid van IPTG er dan ongeveer uitgezien hebben?
6. Stel, er is recent van een eencellige ziekteverwekker uitgezocht hoe de voortplantingsregulatie in elkaar zit. Je weet dus welke enzymen de belangrijkste processen voor voortplanting katalyseren. Je wilt nu een een medicijn ontwikkelen dat de voortplanting van deze ziekteverwekker remt. Naar wat voor soort verbindingen zou je het eerst op zoek gaan? Zouden deze stoffen een hoge of een lage dissociatieconstante moeten hebben?

2.6 Referenties

Fischer, E. (1894a), 'Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme.', *Ber Dtsch Chem Ges* **27**, 2985–2993. DOI: 10.1002/cber.18940270364

Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913), 'Die Kinetik der Invertinwirkung' (Kinetics of the action of invertin), *Biochem. Zschr.* **49**, 333–369

Briggs, G. E. & Haldane, J. B. (1925), 'A Note on the Kinetics of Enzyme Action.', *Biochem. J.* **19**(2), 338–0.

Dixon, M. (1953), 'The determination of enzyme inhibitor constants.', *Biochem. J.* **55**(1), 170–0.

Eisenthal, R. & Cornish-Bowden, A. (1974), 'The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters.', *Biochem. J.* **139**(3), 715–720.

Voet, Voet & Pratt, 'Fundamentals of Biochemistry', 3rd edition, Chapter **12** (*Properties of Enzymes*); Section **28-2** (*Regulation of Prokaryotic Gene Expression*).

3. Centrifugatie

3.1 Inleiding

Van de drie scheidingstechnieken die we in dit practicum behandelen (centrifugatie, chromatografie en elektroforese) is centrifugatie de oudste methode. Vóór de ontwikkeling van de eerste laboratorium-centrifuges aan het eind van de 19^e eeuw, was het voor onderzoekers lastig om suspensies zoals bloed-serum te scheiden in losse fracties met verschillende deeltjes (zoals cellen, organellen en macromoleculen). Voor zo ver het mogelijk was waren ze aangewezen op trage en weinig exacte scheidingsmethodes zoals filtratie en natuurlijke sedimentatie. Centrifugatie is gebaseerd op versnelde sedimentatie, als gevolg van de middelpuntvliedende kracht die ontstaat bij snel ronddraaien om een vaste as. Deeltjes zullen hierbij neerslaan, met een relatieve snelheid die wordt bepaald door hun massa, volume en vorm. Ondanks de leeftijd van de methode heeft centrifugatie als scheidingstechniek nog steeds een aantal belangrijke toepassingen. Het wordt bijvoorbeeld gebruikt voor het scheiden van relatief grote deeltjes zoals cellen, organellen en virussen. Bovendien is het mogelijk om deeltjes te scheiden op basis van dichtheid.

Naast preparatief gebruik voor het scheiden van suspensies in losse fracties, heeft centrifugatie een aantal belangrijke analytische toepassingen. Voor de uitvinding van de analytische ultracentrifuge in 1923 was het moeilijk tot onmogelijk om de molecuulmassa en het volume van (macro)moleculen zoals eiwitten te bepalen. Molecuulmassa werd bepaald aan de hand van de osmolariteit van een zuivere oplossing (gemeten aan de hand van vries- en kookpuntverschuiving), maar dit was omslachtig en gaf bovendien alleen het gemiddelde molecuulgewicht van de opgeloste stoffen. Met behulp van een ultracentrifuge kan niet alleen de distributie van molecuulmassa's in een oplossing bepaald worden, maar kan ook informatie worden verkregen over de grootte, vorm en opbouw van de opgeloste (macro)moleculen. Het belang van centrifuges voor de analyse van biologische moleculen is onder meer te zien aan het feit dat de naamgeving van ribosomen en hun subunits (bijvoorbeeld 70S, 50S, 30S) nog steeds is gebaseerd op hun sedimentatiesnelheid, uitgedrukt in svedberg (S).

In deze proef zullen we centrifugatie gebruiken om celorganellen (in dit geval chloroplasten) te isoleren uit cellen. Vervolgens zullen we door middel van evenwichts-centrifugatie de dichtheid van de organellen bepalen.

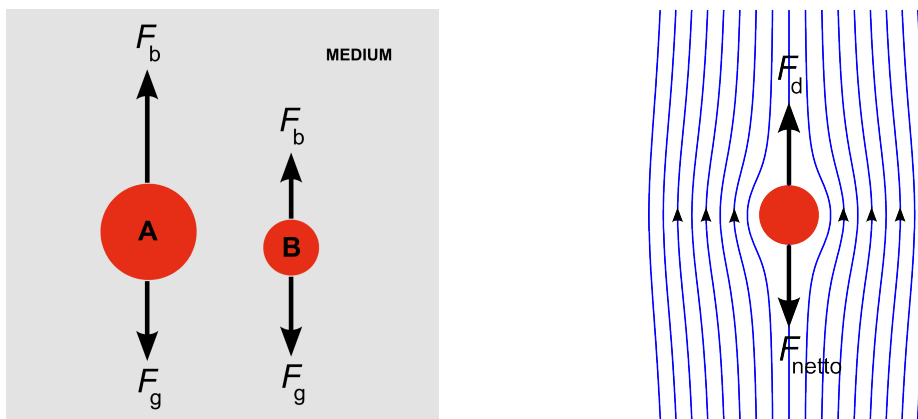
3.2 Achtergrond en theorie

Sedimentatie en dichtheid

De werking van een centrifuge berust op twee belangrijke principes, namelijk sedimentatie (het “neerslaan” van deeltjes) en relatieve dichtheid (het “drijfvermogen” van deeltjes). Stel je neemt een mengsel van grof zand, fijne klei en piepschuim-bolletjes. Als je dit mengsel suspendeert in een bekeerglas met water, vindt automatisch een scheiding plaats in plaats en tijd. De piepschuim-bolletjes zullen vrijwel direct naar het oppervlak stijgen en het zand zal vrij snel bezinken, en na verloop van tijd zal ook de klei neerslaan. Dit is ongetwijfeld een bekend beeld, maar wat is het mechanisme hierachter?

Een deeltje of een object dat gesuspendeerd is in een medium (bijvoorbeeld water of lucht) ondervindt twee tegengestelde krachten, zwaartekracht en *buoyancy* (vrij vertaald als “drijfvermogen” of “opwaartse druk”). De zwaartekracht F_g die een object ondervindt is afhankelijk van zijn massa m , en van de zwaartekrachtsversnelling g (op zeeniveau gemiddeld $9.81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$): $F_g = m\cdot g$ (in newton). Merk op dat deze kracht exact de definitie van *gewicht* is, in vacuüm (niet te verwarren met *massa*, dat zijn verschillende begrippen!). *Buoyancy-force* F_b is de kracht die nodig is om de massa van het omliggende medium te verplaatsen, met hetzelfde

volume als het object. Een object in bijvoorbeeld water zal eenzelfde volume water weg moeten duwen om te kunnen zinken. Dit wordt het *principe van Archimedes* genoemd. Voor dit wegduwen van water is kracht nodig, die geleverd wordt door zwaartekracht. Een object met een grote massa ondervindt veel zwaartekracht, en zal dus makkelijker water weg kunnen duwen dan een object met een kleine massa. En een klein object hoeft minder water weg te duwen dan een groot object, dus heeft minder kracht nodig. De verhouding tussen massa en volume is de dichtheid, en deze verhouding bepaalt dus of de zwaartekracht hard genoeg aan een object kan trekken om het omliggende medium weg te duwen. Als de gemiddelde dichtheid van een object groter is dan de gemiddelde dichtheid van het omgevings-medium, dan trekt de zwaartekracht harder aan het object dan aan het medium en zal het zinken. Als de dichtheid kleiner is dan trekt de zwaartekracht harder aan het medium dan aan het object, en zal het object dus zelf weggeduwd worden en stijgen. De definitie van buoyancy-force is als volgt: $F_b = \rho \cdot V \cdot g$ (in N). Hierbij is ρ de dichtheid van het medium (in kg per m^3), V het volume van het object (in m^3) en g wederom de zwaartekrachtsversnelling. De term $\rho \cdot V$ geeft de massa van het medium dat verplaatst moet worden, en $\rho \cdot V \cdot g$ is dus hoe hard de zwaartekracht aan dit medium trekt (het *gewicht* van het medium).



Figuur 3.1 Links twee deeltjes A en B met dezelfde massa, maar een verschillend volume. A heeft een lagere dichtheid dan B. De zwaartekracht F_g trekt even hard aan beide deeltjes, maar deeltje A moet een groter volume medium wegduwen dan B. Het medium duwt bij A dus harder terug (F_b) dan dat de zwaartekracht trekt (F_g), dus de netto kracht ($F_b - F_g$) is naar boven gericht. Bij object B is het andersom, en is de netto-kracht ($F_g - F_b$) naar beneden gericht. Rechts een deeltje dat naar beneden beweegt. Het bereikt al snel een constante snelheid omdat de wrijvingskracht F_d net zo groot wordt als de netto-kracht.

Als F_g en F_b niet even groot zijn dan ondervindt het object een netto-kracht (dit is wederom de definitie van *gewicht* voor dit object, maar ditmaal niet in vacuüm!). Hierdoor zal het versnellen, volgens de tweede wet van Newton: $a = F_{\text{netto}} / m$. Echter, met de snelheid neemt ook de wrijving toe. Wrijving wordt veroorzaakt door viscositeit van het medium. In vloeistoffen is de viscositeit hoger dan in gassen, de moleculen van een vloeistof zijn immers moeilijker uit elkaar te duwen. Voor lage snelheden en/of kleine deeltjes (laminare stroming) geldt dat de wrijving met het medium lineair toeneemt met de snelheid van het object of deeltje: $F_d = b \cdot v$. Hierbij is F_d de wrijvingskracht (*viscous resistance* of *Stokes' drag*, in N), v de snelheid (in $m \cdot s^{-1}$) en b een wrijvingsconstante (*drag constant*, in $N \cdot m^{-1} \cdot s$ of $kg \cdot s^{-1}$). Deze wrijvingsconstante hangt af van de grootte van het deeltje en de viscositeit van het medium.

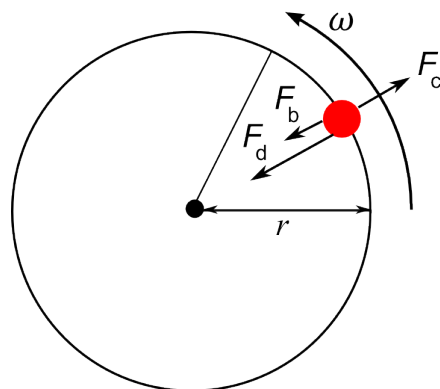
Een object of deeltje zal dus versnellen totdat een maximum-snelheid bereikt is, waarbij de wrijving net zo groot is als de eerder genoemde netto-kracht F_{netto} . Daarna blijft de snelheid constant, deze snelheid noemen we de *terminal velocity* (v_t). De terminal velocity bepaalt de tijd die deeltjes nodig hebben om te bezinken (of te stijgen). Ze is afhankelijk van eigenschappen van het medium (dichtheid en viscositeit), eigenschappen van het deeltje (dichtheid, grootte en vorm), en van de zwaartekrachtsversnelling.

Middelpuntvliedende kracht

Sedimentatie door zwaartekracht is al heel lang in gebruik als scheidingsmethode. De oude Grieken gebruikten sedimentatie in grote bassins om klei te scheiden in fracties met verschillende korrelgroottes, voor het maken van vazen. En de Zwitserse arts en onderzoeker Friedrich Miescher isoleerde in 1869 voor het eerst nucleïnezuren (RNA en DNA) uit celkernen, met behulp van sedimentatie.

Echter, voor het scheiden van kleine deeltjes is sedimentatie door zwaartekracht onpraktisch, en vaak zelfs onmogelijk. De bezinkingstijd kan erg lang zijn, en bovendien speelt diffusie een belangrijkere rol naarmate deeltjes kleiner worden. Bij de meeste moleculen is diffusie (door warmte en botsingen met andere moleculen) sterker dan sedimentatie, zodat ze nooit neer zullen slaan als gevolg van alleen zwaartekracht.

Een eenvoudige oplossing voor dit probleem is om de zwaartekracht te vervangen door iets sterkers: de middelpuntvliedende kracht. Als je een object ronddraait om een as dan zal het object een middelpuntzoekende kracht (*centripetaalkracht*) ondervinden, die het object vasthoudt aan de as. Vanuit of vanaf het ronddraaiende object gezien “voelen” deeltjes echter een middelpuntvliedende kracht (*centrifugaalkracht*), en worden ze naar buiten versneld. Iedereen die wel eens in of op een draaimolen heeft gezeten kent dit, en weet ook dat deze middelpuntvliedende kracht toeneemt met de draaisnelheid en met de afstand tot het centrum. Om precies te zijn, de centrifugaalkracht is: $F_c = m \cdot \omega^2 \cdot r$, waarbij ω de draai- of hoeksnelheid is (in $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$), en r de afstand tot het centrum (straal of *radius*, in m) en m de massa van het deeltje. De bijbehorende *centrifugaalversnelling* is dus $a_c = \omega^2 \cdot r$. In centrifuges worden over het algemeen draaisnelheden bereikt die ervoor zorgen dat de centrifugaalkracht vele malen groter is dan de zwaartekracht. De sedimentatiesnelheid van deeltjes is in een centrifuge dus ook vele malen hoger. De krachten en relaties die eerder beschreven zijn voor sedimentatie blijven uiteraard gelden, alleen wordt de zwaartekrachtversnelling g vervangen door de centrifugaalversnelling a_c . Een belangrijk verschil met zwaartekracht is echter wel dat de centrifugaalversnelling toeneemt met r , de afstand tot het centrum.



Figuur 3.2 De centrifugaalkracht F_c die wordt uitgeoefend op een deeltje in een centrifuge neemt toe met de massa van het deeltje, met de hoeksnelheid ω en met de radius r (de afstand tot de centrifuge-as). De centrifugaalkracht F_c wordt tegengewerkt door de “drijfkracht” F_b en de wrijvingskracht F_d .

De centrifuge

Voor zo ver bekend werd de eerste “scheidings”-centrifuge in 1799 gebouwd door een Fransman genaamd Pochon, voor het drogen van kleding. Halverwege de 19^e eeuw werden eenvoudige hand-aangedreven centrifuges ook gebruikt om suikerkristallen te scheiden van siroop, en later voor het scheiden van room en melk. De eerste centrifuges voor wetenschappelijk gebruik verschenen tegen het eind van de 19^e eeuw, meestal aangedreven met

de hand of door een pedaal. Deze centrifuges werden vooral gebruikt om neergeslagen zouten en (cel-)suspensies te scheiden. In 1912 kwamen de eerste elektrische centrifuges op de markt, en in 1923 werd de eerste analytische ultracentrifuge gebouwd door de Zweedse fysisch-chemicus Theodor Svedberg. Hij gebruikte deze om voor het eerst de subunit-structuur en de molecuulmassa-verdeling van een eiwit (hemoglobine) te bepalen. Voor zijn werk met de ultracentrifuge ontving hij in 1926 de Nobelprijs.

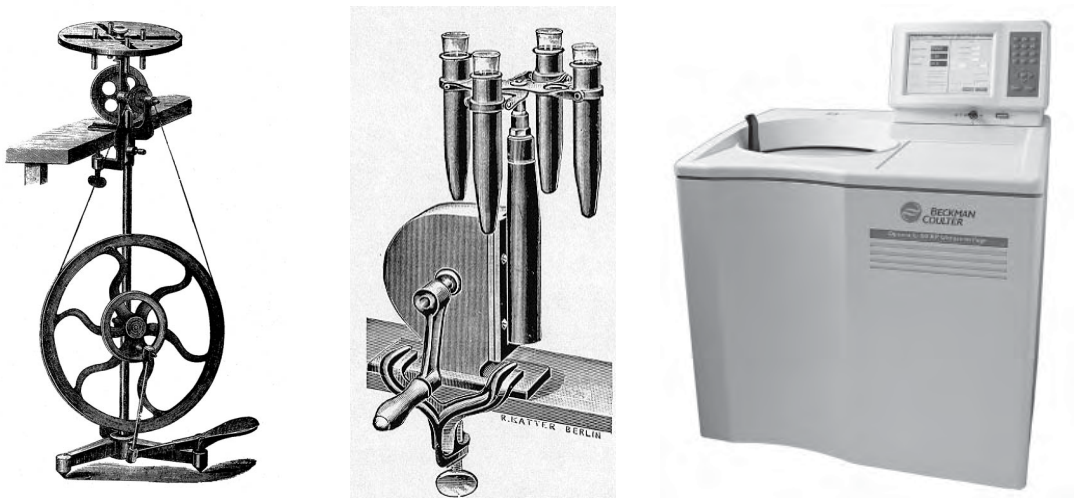
Er zijn verschillende typen centrifuge, die vooral van elkaar verschillen in maximale draaisnelheid. Bij centrifuges wordt de draaisnelheid meestal uitgedrukt in omwentelingen per minuut (RPM, *revolutions per minute*). De verhouding tussen de hoeksnelheid ω (in radiaal per seconde) en de omwentelingssnelheid in RPM is als volgt:

$$\omega = \frac{\text{RPM}}{60 \times 2\pi}$$

De maximale draaisnelheid in combinatie met de straal van de gebruikte rotor bepaalt de centrifugaalversnelling waaraan een monster kan worden blootgesteld. Deze centrifugaalversnelling wordt vaak uitgedrukt ten opzichte van de zwaartekrachtsversnelling, als een *g*-waarde. Dit heet dan de *relative centrifugal force* (RCF):

$$\text{RCF} = \frac{a_c}{g} = \frac{r \cdot \omega^2}{g}$$

De eerste laboratoriumcentrifuges waren handcentrifuges, en hadden een maximale draaisnelheid van ongeveer 3000 RPM (enigszins afhankelijk van de gebruiker natuurlijk). Een moderne ultracentrifuge draait in vacuüm en kan snelheden halen tot 150,000 RPM. De buitenkant van de titanium rotor haalt daarbij ongeveer drie keer de geluidssnelheid, en de centrifugaalversnelling die ermee behaald kan worden ligt rond de 10^6 g!

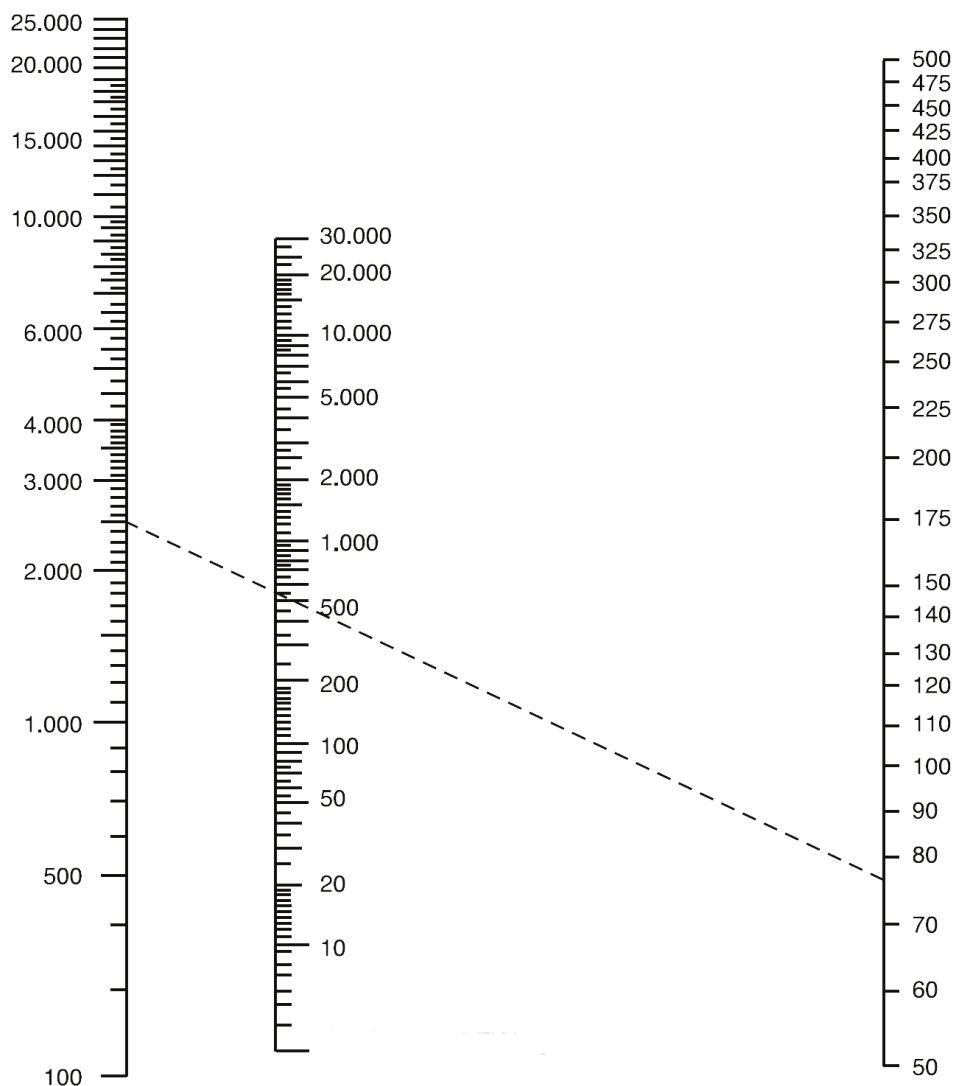


Figuur 3.3 Drie typen centrifuges, links een pedaal-aangedreven model uit 1891, midden een hand-aangedreven “tafelcentrifuge” uit 1912, en rechts een moderne ultracentrifuge.

Sedimentatiecoëfficiënt en k-factor

Aangezien de terminal velocity en dus de sedimentatiesnelheid van een deeltje onder meer afhangt van de zwaartekrachts- of centrifugaalversnelling, wordt meestal gebruik gemaakt van een *sedimentatiecoëfficiënt*:

$$s = \frac{v_t}{a}$$



Figuur 3.4 Als de draaisnelheid van een centrifuge gegeven wordt in RPM, dan wordt de RCF (g-waarde) vaak bepaald met de gemaks-formule $RCF = 11.2 \times r \times \left(\frac{RPM}{1000}\right)^2$. In deze formule zijn al de waarde van g en de extra stap van het omrekenen RPM naar hoeksnelheid verwerkt. De straal r moet hierbij gegeven worden in cm. Echter, een nog snellere manier om de relatieve centrifugaalkracht te bepalen is grafisch, met een zogenaamd *nomogram*. Als je een lineaal legt langs de centrifuge-snelheid (linker-schaal, in RPM) en de straal (rechter-schaal, in cm), dan kun op de middelste schaal de g -waarde aflezen die wordt ondervonden in het bijbehorende punt in de centrifugebuis.

Deze sedimentatiecoëfficiënt geeft de sedimentatiesnelheid ten opzichte van de uitgeoefende versnelling. Bij zwaartekracht geldt dus $s = \frac{v_t}{g}$, en bij centrifugaalkracht $s = \frac{v_t}{a_c} = \frac{v_t}{\omega^2 \cdot r}$. Hiermee wordt de sedimentatiesnelheid in feite genormaliseerd naar de toegepaste versnelling. De waarde van s hangt dan alleen nog af van de eigenschappen van het deeltje en van het medium. Het gebruik van de sedimentatiecoëfficiënt in plaats van de sedimentatiesnelheid maakt het dus ook mogelijk om resultaten te vergelijken tussen verschillende centrifuges. Zonder normalisatie zou dit lastig zijn, aangezien de versnelling a_c zal variëren met de draaisnelheid en de radius van een centrifuge. De eenheid van de sedimentatiecoëfficiënt is svedberg (S).

Zoals gezegd hangt de waarde van s af van eigenschappen van het deeltje (dichtheid en grootte) en het medium (dichtheid en viscositeit). Als de eigenschappen van het medium bekend zijn dan kun je door s te meten in principe (dat wil zeggen, met wat extra informatie uit andere

metingen) de dichtheid, de grootte of de massa van een deeltje bepalen. En andersom, als s van een deeltje bekend is en je weet de eigenschappen van een centrifuge, dan kun je schatten hoeveel tijd nodig is voor sedimentatie van het deeltje.

De eigenschappen van een centrifuge worden meestal samengevat in een *clearing factor*, beter bekend als de k factor. Met behulp van deze factor kun je de sedimentatietijd t_s schatten voor een deeltje waarvan de sedimentatiecoëfficiënt s bekend is:

$$t_s = \frac{k}{s}$$

Meestal wordt k zo berekend dat de sedimentatietijd t_s gegeven wordt in uren. De k factor wordt bepaald door de draaisnelheid en de radius van een centrifuge-rotor, als volgt:

$$k = \frac{\ln(r_{\max}/r_{\min})}{\omega^2} \times \frac{10^{-13}}{3600} \quad \text{of} \quad k = \frac{2.53 \cdot 10^5 \times \ln(r_{\max}/r_{\min})}{(\text{RPM}/1000)^2}$$

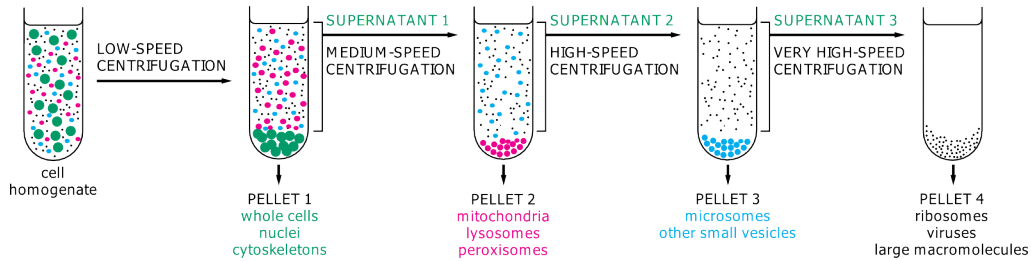
Hierbij is r_{\max} de grootst mogelijke afstand tussen een deeltje en de rotor-as, r_{\min} de kleinste mogelijke afstand, en ω de hoeksnelheid. De k factor voor een gegeven combinatie van centrifuge en rotor wordt meestal gegeven door de fabrikant. Deze geldt voor de maximale snelheid van de centrifuge, en voor sedimentatie in water bij 20°C. Bij gebruik van een andere draaisnelheid moet k gecorrigeerd worden, als volgt:

$$k_{\text{nieuw}} = k \cdot \frac{\text{maximum rotor-snelheid}}{\text{gebruikte rotor-snelheid}}$$

Bij gebruik van een ander medium dan water, of een andere temperatuur dan 20°C, moet ook de sedimentatiecoëfficiënt gecorrigeerd worden.

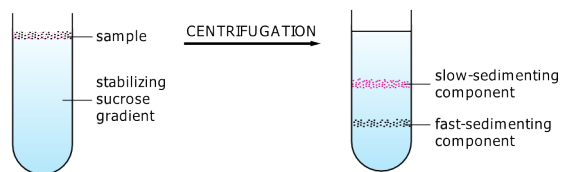
Centrifugatietechnieken

Differentiële sedimentatie is de meest eenvoudige scheidingstechniek door middel van centrifugatie, en wordt vooral veel gebruikt voor “groffe” scheidingen van cellen, celorganellen en soms macromoleculen. Als een suspensie van deeltjes met verschillende groottes wordt gecentrifugeerd, zullen de deeltjes met de grootste sedimentatiecoëfficiënt als eerste neerslaan in een laag (*pellet*) op de bodem van de centrifugebuis. Vervolgens kan de rest van de suspensie (het *supernatant*) afgegoten worden, en opnieuw worden gecentrifugeerd totdat de volgende fractie is neergeslagen in een pellet, enzovoort. Scheiding gebeurt dus op basis van de sedimentatiesnelheid van verschillende deeltjes, die afhangt van dichtheid, grootte, massa en vorm van de deeltjes. Als de sedimentatiecoëfficiënt van een deeltje bekend is kan met behulp van de k factor van de rotor berekend worden hoe lang (of hoe snel) er gecentrifugeerd moet worden om een bepaald deeltje te sedimenteren. Het nadeel van deze methode is echter dat er vrij grote hoeveelheden deeltjes nodig zijn, en dat het moeilijk is om een goede scheiding te verkrijgen. Als de sedimentatiecoëfficiënten van deeltjes niet veel van elkaar verschillen dan zullen ze in dezelfde fractie terecht komen. Bovendien zijn aan het begin van de centrifugatie-run alle deeltjes gelijkmatig verspreid over de buis. Grote en/of zware deeltjes zullen als eerste neerslaan omdat ze sneller naar de bodem migreren, maar kleinere en/of lichtere deeltjes *die zich al onderin de buis bevonden* zullen ook snel neerslaan, en dus de eerste pellets “verontreinigen”. Met andere woorden, om een goede scheiding te krijgen zouden alle deeltjes eigenlijk bovenin de buis moeten beginnen. Dit idee vormt de basis voor *zonale sedimentatie*.



Figuur 3.5 Een voorbeeld van differentiële centrifugatie met verschillende snelheden.

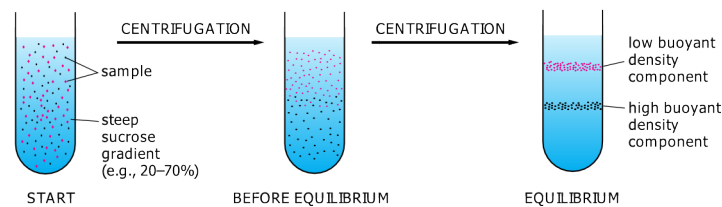
Bij **zonale sedimentatie** (*rate zonal centrifugation*) wordt een kleine hoeveelheid van het te scheiden mengsel opgebracht bovenin een buis waarin zich een medium met een *continue dichtheidsgradiënt* bevindt. Dit wil zeggen dat de dichtheid van het medium gelijkmatig oploopt in de sedimentatie-richting. Dergelijke gradiënten kunnen bijvoorbeeld gemaakt worden met oplopende concentraties sucrose, of met een sedimentatie-gradiënt van silica-deeltjes (Percoll) of zouten zoals cesiumchloride. Als je een mengsel op zou brengen op een medium zonder dichtheidsgradiënt, dan zouden ongelijkmatigheden in de verdeling van dit mengsel er al snel toe leiden dat lokale gebiedjes een iets grotere dichtheid krijgen. Deze “oepenhopingen” van deeltjes zouden vervolgens sneller naar de bodem zakken dan de rest, en dus een goede scheiding onmogelijk maken. Als we echter een continue gradiënt van oplopende dichtheid aanbrengen in het medium, zorgt deze ervoor dat kleine dichtheids-verschillen niet meteen groter worden (*hydrodynamische stabilisatie*). In aanwezigheid van een (zwakke) dichtheidsgradiënt zullen deeltjes netjes zones vormen, die met een verschillende snelheid naar beneden migreren, aan de hand van hun sedimentatiecoëfficiënt. De dichtheidsgradiënt moet echter wel zodanig gekozen worden dat de dichtheid van het medium overal lager is dan de dichtheid van alle te scheiden deeltjes. Ook moet de centrifugatie op tijd gestopt worden, anders zullen alsnog alle fracties op de bodem terecht komen. Uiterlijk op het moment dat de eerste fractie de bodem van de centrifugebuis heeft bereikt moet de buis verwijderd worden. Vervolgens kunnen de zones met verschillende deeltjes afgetapt of voorzichtig uit de buis gepipetteerd worden. Zonale sedimentatie wordt vooral gebruikt voor het scheiden van deeltjes waarvan de dichtheid ongeveer even groot is, zodat scheiding met name plaatsvindt op basis van grootte. Dit geldt bijvoorbeeld voor eiwitten: een grotere sedimentatiecoëfficiënt betekent over het algemeen een groter eiwit, aangezien de meeste eiwitten ongeveer dezelfde dichtheid hebben en de massa toeneemt met de grootte van het eiwit.



Figuur 3.6 Een voorbeeld van zonale sedimentatie op een dichtheidsgradiënt van sucrose (zie onder). Er zijn speciale centrifugebuizen te koop waarbij je vervolgens een gat in de bodem kunt maken om de verschillende fracties af te tappen.

Deeltjes met verschillende dichtheden kunnen relatief makkelijk gescheiden worden met **evenwichts-sedimentatie** (*equilibrium sedimentation* of *isopycnic centrifugation*). Ook hiervoor wordt een medium met een continue dichtheidsgradiënt gebruikt, maar voor deze techniek moet de gradiënt veel steiler zijn dan bij zonale sedimentatie. In aanwezigheid van een sterke dichtheidsgradiënt zullen deeltjes zich uiteindelijk over de gradiënt verdelen. Deeltjes met een hoge dichtheid zakken naar beneden totdat ze op een plek in de gradiënt komen waar de

dichtheid van het medium hetzelfde is als die van het deeltje. Deze methode is dus zeer geschikt voor het scheiden van deeltjes die ongeveer even groot zijn, maar die verschillen in dichtheid. Dit kunnen cellen of celorganellen zijn, maar de techniek kan bijvoorbeeld ook gebruikt worden voor het scheiden van DNA. Een AT basepaar heeft namelijk een lagere molecuulmassa dan een GC basepaar, dus zelfs als twee DNA-ketens even lang zijn kunnen ze gescheiden worden mits ze verschillen in de relatieve verhouding AT / GC. Een andere toepassing is het isoleren van lipoproteïnen. Dit zijn eiwitcomplexen die lipide-groepen bevatten, en die in het menselijk lichaam bijvoorbeeld belangrijk zijn voor de vethuishouding. Lipoproteïnen hebben een lagere dichtheid naarmate ze meer lipiden bevatten. Hierop is ook de indeling van lipoproteïnen gebaseerd. Bekende voorbeelden zijn HDL (*high density lipoproteins*) en LDL (*low density lipoproteins*), die in het bloed respectievelijk “goed” en “slecht” cholesterol transporteren. Met evenwichts-sedimentatie kan een vrijwel volledige scheiding op dichtheid verkregen worden, mits de dichtheid van alle deeltjes volledig binnen het bereik van de gradiënt ligt. Een nadeel is echter dat de centrifugatie-tijd die nodig is om een dichtheids-evenwicht tussen medium en deeltjes te bereiken vrij lang kan zijn.



Figuur 3.7 Een voorbeeld van evenwichts-centrifugatie op een dichtheidsgradiënt van sucrose.

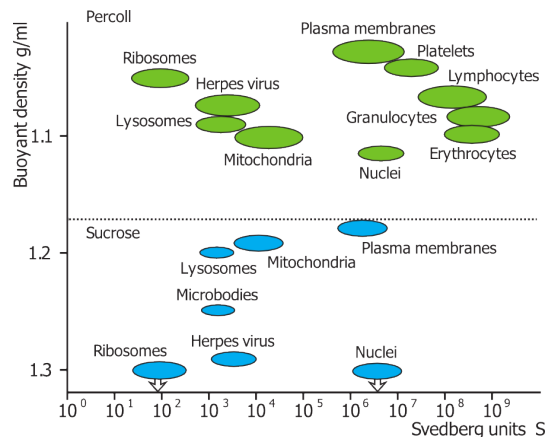
Naast de hierboven beschreven methodes zijn er natuurlijk ook allerlei varianten en combinaties mogelijk. Zo maken sommige technieken gebruik van discontinue of getrapte-dichtheidsgradiënten (*discontinuous gradients* en *step-gradients*), of van continue gradiënten die niet lineair zijn.

Dichtheidsgradiënten

De dichtheidsgradiënten die nodig zijn voor zonale sedimentatie en evenwichts-sedimentatie kunnen op veel verschillende manieren gemaakt worden. Er zijn letterlijk honderden producten op de markt voor het maken van dichtheidsgradiënten, elk met voor- en nadelen voor bepaalde toepassingen. We noemen hier kort de vier meest gebruikte media.

Een traditionele en goedkope methode om dichtheidsgradiënten te maken is het gebruik van een **sucrose**-oplossing met een oplopende concentratie sucrose. Door twee oplossingen met verschillende concentraties sucrose te mengen, en de mengverhouding te veranderen tijdens het vullen van de centrifugebuizen kan makkelijk een continue gradiënt verkregen worden. Met de maximale oplosbare sucrose-concentratie van ongeveer 70% (w/v) kan een maximale dichtheid van ca. $1.35 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ verkregen worden*. Het nadeel van sucrose is echter dat met de concentratie van het medium ook de osmotische waarde en de viscositeit toenemen. Hoge osmolariteit van het medium kan schade toebrengen aan cellen en organellen, en verhoogt ook hun schijnbare dichtheid door het onttrekken van water. Hogere viscositeit vertraagt sedimentatie, omdat het de wrijving van deeltjes met het medium verhoogt. Desalniettemin worden sucrose-gradiënten nog steeds erg veel gebruikt, onder meer omdat de eigenschappen ervan goed bekend zijn.

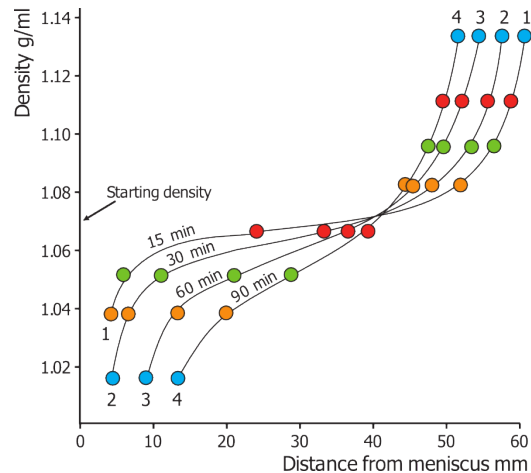
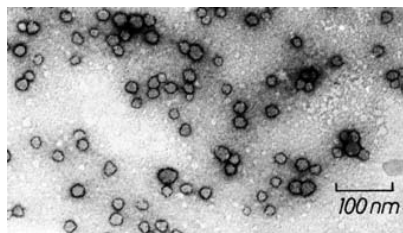
* Ter vergelijking, puur water bij 20°C heeft een dichtheid van $1.0 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, en een gemiddeld blok beton heeft een dichtheid van ongeveer $2.3 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Figuur 3.8 Sedimentatiecoëfficiënten en dichtheden van enkele celorganellen in een sucrose-gradiënt (onder) en in een vergelijkbare Percoll-gradiënt (boven).

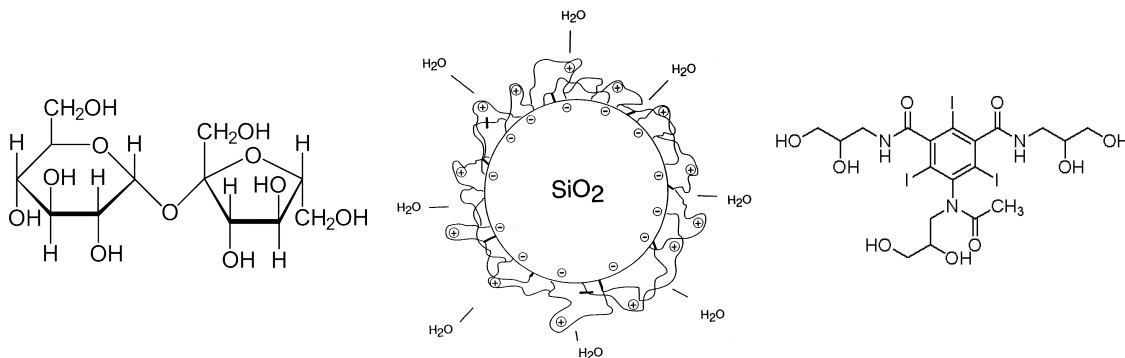
Een praktisch alternatief voor sucrose is **Percoll**, een colloïde suspensie van silica-deeltjes (SiO_2 , in kristal-vorm beter bekend als kwarts). Deze deeltjes hebben een omvang van 15-30 nm en zijn voorzien van een polymeer-coating van polyvinylpyrrolidon (PVP) zodat ze niet schadelijk zijn voor cellen. De silica-deeltjes zelf hebben een dichtheid van $2.2 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, zodat de suspensie al bij lage concentraties een relatief hoge dichtheid heeft. Percoll wordt geleverd als suspensie (23% w/w in water) met een dichtheid van $1.13 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hierdoor kunnen dichtheden tot $1.13 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ behaald worden met een relatief lage osmotische waarde en viscositeit. De silica-deeltjes hebben zelf een redelijk hoge sedimentatiecoëfficiënt. Dit is zowel een nadeel als een voordeel. Het nadeel is dat het alleen gebruikt kan worden voor het scheiden van deeltjes met een coëfficiënt $> 60\text{-}90 \text{ S}$, die sneller sedimenteren dan Percoll zelf. Het voordeel is echter dat het mogelijk is om vanzelf een gradiënt te laten vormen (rondom de gemiddelde dichtheid) door een Percoll-oplossing te centrifugeren boven de 10,000 g. De gradiënt ontstaat doordat sedimentatie zorgt voor een toename van deeltjes richting de bodem van de buis, die echter weer wordt tegengewerkt door diffusie in de tegenovergestelde richting.

Bovenstaande media zijn te gebruiken voor het scheiden van cellen en/of celorganellen op dichtheid, maar veel macromoleculen hebben een dichtheid die hoger ligt dan die van sucrose. De dichtheid van de meeste eiwitten is $1.2\text{-}1.5 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, DNA heeft een dichtheid van $1.5\text{-}1.7 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en RNA zelfs $1.7\text{-}2.0 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Voor evenwichts-sedimentatie van DNA en RNA worden wel gradiënten gebruikt van zware zouten, zoals **cesiumchloride** (CsCl). Net als de silica-deeltjes van Percoll zal een oplossing van CsCl bij een hoge centrifugatie-snelheid vanzelf een dichtheidsgradiënt vormen. De maximale dichtheid van CsCl ($1.9 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$) is voldoende voor het scheiden van DNA en veel RNA moleculen. Cesiumchloride is echter giftig voor levende cellen, en gaat ook interacties aan met eiwitten.



Figuur 3.9 Links een foto van Percoll-deeltjes gezien door een microscoop. De variatie in grootte van de deeltjes helpt bij het vormen van de dichtheidsgradiënt. Rechts de vorming van een dichtheidsgradiënt gezien over de tijd. De gradiënt vormt zich rondom de gemiddelde dichtheid van de suspensie. Als je doorgaat met centrifugeren komen uiteindelijk alle Percoll-deeltjes onderin de buis terecht.

Voor het scheiden van eiwitten wordt tegenwoordig veel gebruikt gemaakt van een gradiënt van **Nycodenz** (ook verkocht onder de naam Histodenz), een synthetische niet-ionogene stof die oorspronkelijk is ontwikkeld als contraststof voor röntgenfotografie. Net als Percoll en CsCl vormen Nycodenz-oplossingen in een centrifuge zelf een dichtheidsgradiënt. Echter in tegenstelling tot CsCl is Nycodenz niet schadelijk voor cellen, organellen en eiwitten, en in vergelijking met Percoll heeft het een hogere maximale dichtheid van $1.4 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Figuur 3.10 Sucrose, Percoll en Nycodenz. Sucrose is simpelweg tafelsuiker, en heeft bij hoge concentraties een hoge dichtheid, maar ook een hoge osmotische waarde. Percoll bestaat uit silica-deeltjes met een coating van PVP-polymeren, en is veel zwaarder dan sucrose. Er zijn veel lagere concentraties nodig voor dezelfde dichtheid. Nycodenz is oorspronkelijk een contraststof voor röntgenfotografie, en heeft in oplossing eveneens een hogere dichtheid dan sucrose.

Soorten centrifuges

Grofweg zijn laboratoriumcentrifuges onder te verdelen in drie typen:

- **Tafelcentrifuges** hebben, afhankelijk van het type een maximumsnelheid tot ongeveer 10,000 RPM. De grotere tafelcentrifuges zijn geschikt voor reageerbuizen (tot 2,000 g) of centrifugebuizen, en eppendorfcentrifuges werken met 1.5 ml epjes. Een tafelcentrifuge genereert een RCF van maximaal 5,000-10,000 g, is meestal niet gekoeld en wordt onder meer gebruikt om cellen, celfragmenten en neergeslagen zouten

af te draaien.

- **High-speed centrifuges** bereiken snelheden tot zo'n 30,000 RPM. Wrijving zorgt bij deze snelheden voor significante warmteproductie, dus dit type centrifuge is vrijwel altijd gekoeld en de snellere modellen gebruiken zelfs vacuüm-systemen om wrijving te verminderen. High-speed centrifuges genereren een RCF tot ongeveer 120,000 g, en worden vooral gebruikt voor het isoleren van celorganellen en virussen.
- **Ultracentrifuges** werken bij snelheden van 30,000-150,000 RPM, zijn altijd gekoeld en draaien in vacuüm. Bij dergelijke snelheden vervormen de meeste vaste materialen, vandaar dat gewerkt wordt met speciale centrifugebuizen en rotors. Goed onderhoud en het volgen van procedures is ook erg belangrijk bij deze apparaten. Alles dat losraakt heeft bij een RCF van ca. 600,000-1,000,000 g immers het effect van een kleine fragmentatiebom, en kan een enorme ravage aanrichten. Ultracentrifuges worden gebruikt om membraan-onderdelen, endosomen, ribosomen en macromoleculen te isoleren.

Ultracentrifuges zijn verder onder te verdelen in preparatieve en analytische ultracentrifuges. Preparatieve exemplaren komen het meest voor in laboratoria, voor het scheiden van deeltjes zoals hierboven beschreven. Analytische ultracentrifuges (AUC) zijn meer specialistische apparaten, waarbij het mogelijk is om *real-time* de absorptie van licht over de lengte van de centrifugebuis te meten tijdens het centrifugeren. Deze apparaten worden vooral gebruikt voor onderzoek aan eiwitcomplexen en -interacties (zie onder).



Figuur 3.11 Links een eppendorf-tafelcentrifuge. Rechts wat er kan gebeuren als je het verkeerde type rotor gebruikt in een ultracentrifuge. Bij dit ongeluk in 1998 werd een ruimte compleet vernield.

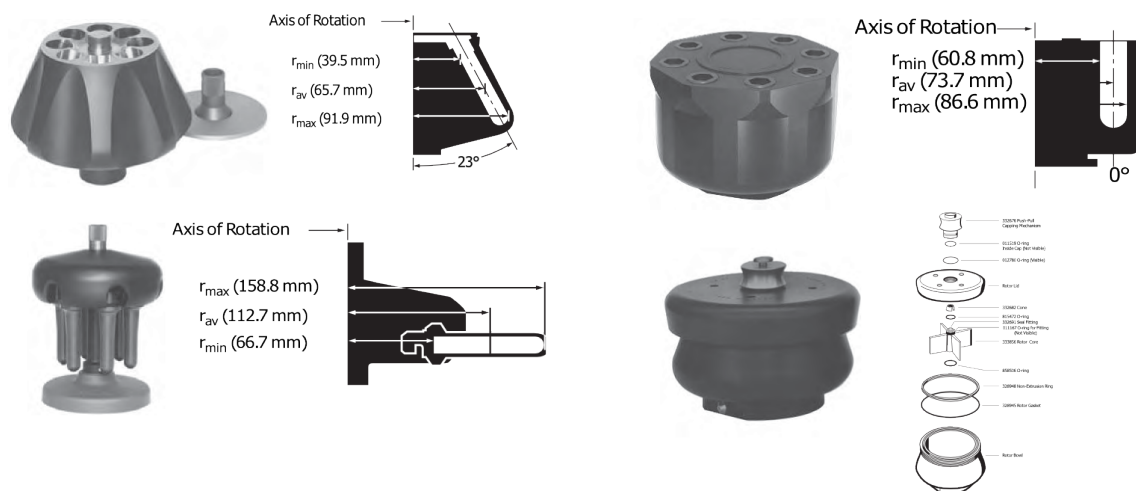
Rotors

De voornaamste verschillen tussen rotors zijn de hoeken waaronder de buizen gehouden worden tijdens het centrifugeren. In de bovenstaande tekst werd af en toe gesproken over de bodem van de reageerbuis, maar strikt gezien is dit niet altijd correct. De meeste rotors zijn namelijk zogenaamde **hoekrotors** (*fixed-angle rotors*), waarbij de buizen onder een vaste, schuine hoek zijn geplaatst ten opzichte van de rotor-as. Het voordeel is dat deze constructie veel steviger is, en dus gebruikt kan worden bij hogere snelheden. Bovendien hoeven de te sedimenteren deeltjes een minder lange afstand af te leggen dan bij een horizontale buis. Het nadeel is natuurlijk dat de scheidingszones parallel zijn aan de rotor-as, maar schuin zijn ten opzichte van

de buis zelf. Dit kan leiden tot menging als de vloeistoflagen “omklappen” aan het eind van de run, als de zwaartekracht het weer overneemt van de centrifugaalkracht. Ook wordt de resolutie van de scheiding slechter naarmate de sedimentatie-weg korter is. Het meest extreme geval is de verticale rotor, waar de buizen rechtop instaan. Scheiding vindt hierbij dus alleen plaats in de breedte van de buis, niet in de lengte!

Swing-out of *swinging-bucket* rotors hebben een scharnier, zodat de buis zich altijd richt naar het heersende krachtveld. Tijdens centrifugatie liggen de buizen horizontaal, zodat de sedimentatie-afstand maximaal is. Omdat de buis geleidelijk naar buiten en naar binnen klapt kan met dit type rotor een betere scheiding worden verkregen. Echter, omdat het scharnier een zwak punt is kan de swing-out rotor alleen gebruikt worden bij relatief lage snelheden.

Naast de bovenstaande drie typen bestaan er ook nog zogenaamde *zonal rotors*. Deze bevatten überhaupt geen centrifugebuizen, maar bestaan uit een enkele holle kamer. Ze worden gebruikt in *continuous flow centrifugation*, een techniek waarbij medium en sample *tijdens het draaien* van de centrifuge geïnjecteerd en afgetapt kunnen worden. Dergelijke apparaten zijn geschikt voor het scheiden van grote hoeveelheden monster.



Figuur 3.12 Voorbeelden van verschillende rotor-typen. Met de klok mee, een hoekrotor, een verticale rotor, een swing-out rotor en een zonale rotor.

Geavanceerde toepassingen

Centrifugatie is zeer geschikt voor het scheiden van relatief grote deeltjes, zoals cellen, virussen en organellen. Bovendien is centrifugatie de enige manier om deeltjes te scheiden op dichtheid. Voor het scheiden van macromoleculen op grootte, massa of affiniteit zijn tegenwoordig echter eenvoudigere methodes beschikbaar, zoals gelfiltratie (proef 4) en gelelectroforese (proef 6).

Naast preparatieve centrifuges voor het uitvoeren van separaties, worden analytische ultracentrifuges tegenwoordig veel gebruikt voor onderzoek. Deze apparaten bieden namelijk de unieke mogelijkheid om reacties met eiwitten real-time te kunnen volgen. Door de plek van (UV-)absorptiepieken (zie proef 1 en 5) te meten kan bepaald worden waar in de buis zich eiwitten, eiwitcomplexen, subunits en andere stoffen bevinden. Op die manier kunnen onder meer sedimentatiecoëfficiënten gemeten worden. Als de massa van een molecuul bekend is dan kun je de sedimentatiecoëfficiënt gebruiken om informatie te verkrijgen over de vorm ervan.

Naast het laten neerslaan van moleculen is het ook mogelijk om een sedimentatie-evenwicht te creëren (niet te verwarren met de scheidingstechniek evenwichts-sedimentatie!). In feite werkt dat hetzelfde als de vorming van dichtheidsgradiënten in CsCl en Nycodenz. Eiwitten worden

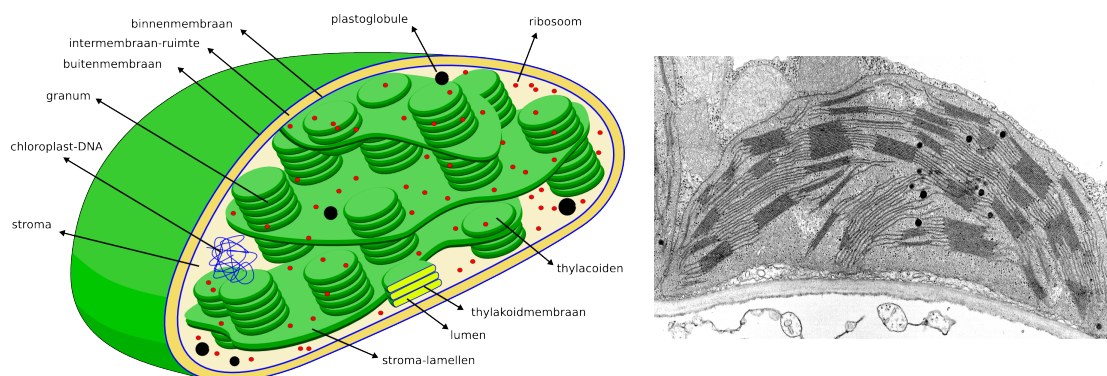
bij een relatief lage snelheid gecentrifugeerd, zodat ze net niet neerslaan. Na verloop van tijd ontstaat er een evenwicht tussen sedimentatie en diffusie. Uit de positie van eiwitten in de buis kun je vervolgens met behulp van speciale software de molecuulmassa afleiden.

Bovenstaande metingen kunnen onder meer gebruikt worden om eiwit-configuraties (monomeer, dimeer, trimeer etc.) en opbouw (bij complexen) af te leiden. Ook is het mogelijk om evenwichtsconstantes te meten van associatie- en dissociatie-processen, en van allerlei proteïne-interacties.

3.3 Over de proef

In deze proef zullen we differentiële centrifugatie gebruiken om chloroplasten te isoleren uit de cellen van spinaziebladeren. Vervolgens zullen we met behulp van evenwichts-sedimentatie op een Percoll-gradiënt bepalen wat de dichtheid is van de verschillende (zichtbare) fracties. We werken met een gekoelde high-speed centrifuge.

We kiezen voor de isolatie van chloroplasten voor deze proef omdat omdat deze makkelijk te zien zijn met het blote oog. Zoals bekend zijn chloroplasten in de cellen van planten en algen de organellen waarin fotosynthese plaatsvindt. Samen met mitochondrieën behoren ze tot de belangrijkste celorganellen voor (meercellig) leven op aarde. Fotosynthese is immers de energiebron voor vrijwel alle ecosystemen (inclusief mensen) en houdt de zuurstof-atmosfeer in stand. Chloroplasten zijn hoogstwaarschijnlijk ontstaan als *endosymbiose* met cyanobacteriën, die in grotere cellen leefden en deze voorzagen van energie. Gezien door een microscoop zijn het enigszins platte, meestal ronde organellen met een doorsnede van 2-10 μm en een dikte van 1-4 μm . Intern bestaan ze uit een aantal membranen waarin grote eiwit-complexen (*fotosystemen*) en transport-eiwitten zitten. Samen vormen deze eiwitten een transportketen voor elektronen, die vrijkomen als chlorofyl-kleurstoffen in een fotosysteem een foton van 600-700 nm absorberen (zie ook proef 1). Uiteindelijk wordt de energie van de aangeslagen kleurstof omgezet in de energiedragers NADPH en ATP voor gebruik elders in de cel.



Figuur 3.13 Schematische voorstelling en een foto van een chloroplast.

Door de cellen stuk te maken in een blender, maken we chloroplasten en andere organellen vrij uit cellen van spinaziebladeren. Vervolgens filteren we de spinazie-brei door een fijn nylon-doek, en isoleren we de zwaarste fractie door enkele minuten te centrifugeren bij een laag toerental. De pellet zal allerlei celfragmenten bevatten, maar ook chloroplasten, mitochondrieën en andere organellen. Het supernatant zal allerlei lichtere celfragmenten, organellen, organel-fragmenten en opgeloste stoffen bevatten. Het supernatant wordt daarom in de tweede stap langer gecentrifugeerd, en bij een hoger toerental, zodat eventuele lichtere organellen en

organel-fragmenten neerslaan. De pellets uit beide stappen worden vervolgens opnieuw gesuspenseerd en op een sterke Percoll-gradiënt gecentrifugeerd om de organellen te scheiden op dichtheid. Met behulp van dichtheidsmarkers wordt uiteindelijk de dichtheid van de verschillende chloroplast-fracties bepaald.

Dichtheidsmarkers (*density beads*) zijn gekleurde bolletjes met een bekende dichtheid. Ze bestaan uit bolletjes van de glucose-polymeer dextraan (merknaam *Sephadex*, zie proef 4), waarvan de dichtheid gevarieerd kan worden door de hoeveelheid dwarsverbindingen te variëren.

Nummer	Kleur	Dichtheid (g/ml)
1	blauw	1.040
2	oranje	1.052
3	groen	1.055
4	rood	1.069
5	blauw	1.080
6	oranje	1.100
7	groen	1.109
8	rood	1.131
9	violet	1.150

Tabel 3.1 Nummers, kleuren en dichtheden van de gebruikte Sephadex dichtheidsmarkers (GE 17-0459-01 Density Marker Beads). Deze dichtheden gelden in een medium van Percoll met 0.25 M sucrose.

De isolatie van organellen moet in principe altijd bij lage temperatuur gebeuren, om degradatie van de organellen door warmte, chemische reacties en enzymen zo mogelijk te voorkomen. Daarom werken we zo veel mogelijk op ijs, en gebruiken we een gekoelde centrifuge. Bij centrifugeren is het voor de veiligheid altijd belangrijk om te zorgen dat centrifuge en rotor schoon en droog blijven (vanwege roestvorming), dat er geen delen los kunnen raken (bijvoorbeeld doppen van buizen, of glasscherven) en dat de rotor goed gebalanceerd is. Voor dat laatste moeten buizen voor centrifugatie altijd *getarreed* worden. Dit betekent dat je met behulp van een weegschaal twee buizen van exact hetzelfde gewicht maakt, die je tegenover elkaar plaatst in de rotor.

3.4 Handleiding

Benodigdheden

- Isolatiemedium (pH 7.8), bestaande uit:
 - 50 mM Tricine KOH (pH buffer)
 - 300 mM sorbitol (in plaats van sucrose, voor osmotische waarde)
 - 25 mM NaCl
 - 25 mM KCl
 - 5 mM MgCl₂ (de zouten zijn nodig om organellen intact te houden)
- Dubbel geconcentreerd isolatiemedium
- Percoll

- Dichtheidsmarkers
- 2 × 10 ml centrifugebuizen met dop
- 8 × 50 ml centrifugebuizen met dop (per 2-3 groepen)
- ± 250 g spinaziebladeren (per 2-3 groepen)
- blender, bak, ijs, nylon doek, kwastje, liniaal, grafiekpapier, pipetten

Werkwijze

Aangezien het vormen van de Percoll-gradiënt enige tijd duurt, beginnen we met het maken van de dichtheidsgradiënten. Per groepje maken we twee buizen met een Percoll-dichtheidsgradiënt, en voor de hele groep twee buizen met een dichtheidsgradiënt en dichtheidsmarkers.

- Vul twee 10 ml centrifugebuizen met 4.70 ml dubbel geconcentreerd isolatiemedium, en 4.75 ml Percoll.
- Tarreer de buizen. In dit geval is het voldoende om de vloeistof-niveaus te vergelijken: als er goed gepipetteerd is dan zit er even veel vloeistof in beide buizen en zijn ze dus ook even zwaar.
- Voorzie de buizen van een dop, en zet ze tegenover elkaar in de rotor. Schrijf de positie-nummers van de buizen op. Op de centrifugebuizen zelf mag niet geschreven worden!
- In de rotor moeten tevens twee buizen met isolatiemedium, Percoll en dichtheidsmarkers meegenomen worden.
- Centrifugeer gedurende 45 minuten met 17,000 RPM (ca. 35,000 g) bij een temperatuur van 10°C. De lage temperatuur is uiteraard niet nodig voor de vorming van de gradiënt, maar zorgt ervoor dat de buizen alvast voorgekoeld zijn voor de dichtheids-bepaling later.

Terwijl de dichtheidsgradiënten gevormd worden kan de suspensie met chloroplasten geïsoleerd worden uit de spinaziebladeren. Dit doen we in twee groepen van ongeveer 4-8 personen.

- Verwijder de stelen en hoofdnerf, was de bladeren in water met ijs, en spoel ze vervolgens af met koud demiwater.
- Vul de beker van de blender luchtig met bladeren, en voeg 100 ml koud isolatiemedium toe.
- Schakel de blender enkele seconden aan, en schakel deze uit zodra de spinazie-brei viermaal “omhoog springt”.
- Filtreer de verkregen suspensie door een nylon doek. Verdeel het filtraat over vier centrifugebuizen van 50 ml. Voorzie de buizen van een genummerde dop en tarreer ze twee aan twee. Noteer de nummers van de doppen.

Na het prepareren van de suspensies kunnen deze in twee stappen gecentrifugeerd worden om twee verschillende pellets met chloroplast-fractionen te verkrijgen:

- Zorg dat de centrifuge voor aanvang is gekoeld door deze enige tijd aan te schakelen bij 10°C.
- Centrifugeer voor de eerste scheidings-stap de buizen 3 minuten bij 4000 RPM (ca.

1700 g) en een temperatuur van 10°C.

- Giet het supernatant van de buizen af in nieuwe centrifugebuizen. Tarreer de buizen weer twee aan twee, voorziet ze van een dop en noteer de nummers. Bewaar de pellets.
- Voor de tweede scheidings-stap worden de buizen nu 15 minuten gecentrifugeerd bij 13,000 RPM en 10°C.
- Voeg 0.5 ml isolatiemedium toe aan de pellets uit de eerste centrifugatiestap. Suspendeer de pellets met een kwast.
- Giet na het beëindigen van de tweede centrifugatiestap het supernatant af (dit hoeft niet bewaard te worden). Voeg eveneens 0.5 ml isolatiemedium toe aan deze pellets en suspendeer ze met een kwast.

Als de dichtheidsgradiënten en de gesuspendeerde fracties uit de eerdere scheidings-stappen klaar zijn, kunnen de dichtheden van de verschillende fracties bepaald worden:

- Breng 50 µl van de suspensie uit de eerste scheidings-stap op een van de 10 ml centrifugebuizen met de Percoll-dichtheidsgradiënt.
- Breng eveneens 50 µl van de suspensie uit de tweede scheidings-stap op een dichtheidsgradiënt.
- Voorzie beide buizen van een dop, en plaats ze tegenover elkaar in de voorgekoelde rotor. Noteer de positie-nummers. Plaats de ijkgradiënten met de dichtheidsmarkers ook weer in de rotor.
- Centrifugeer de buizen gedurende 20 minuten bij 8000 RPM en 10°C.
- Meet na centrifugatie met een liniaal de posities van alle zichtbare lagen in de buizen, ten opzichte van de meniscus. Meet ook de positie van de dichtheidsmarkers in de ijkgradiënten. Noteer alle posities.

Uitwerking

- Zet op grafiekpapier de dichtheid (y-as) uit tegen de gemeten afstanden van de dichtheidsmarkers ten opzichte van de meniscus (x-as). Vergelijk dit met figuur 3.9.
- Geef de positie van alle zichtbare (chloroplast-)fracties aan in de grafiek, en bepaal de dichtheden van deze fracties.
- Maak voor de gebruikte hoekrotor een grafiek van het verband tussen g -waarde en toerental. Doe dit voor een punt bovenin de buis ($r = 5$ cm) en een punt onderin de buis ($r = 10$ cm). Gebruik het nomogram uit figuur 3.4.
- Zorg dat alle resultaten genoteerd zijn in het labjournaal.

3.5 Vragen

1. Wat is de dichtheid van intacte chloroplasten? Wat zouden de andere zichtbare fracties kunnen zijn?
2. Bepaal wat de positie van spinazie-chloroplasten zou zijn in figuur 3.8. Verwacht je dit resultaat?

3. Wat zou er veranderen aan de resultaten als we deze proef zouden doen bij 20°C.
4. Wat zou er gebeuren als we bij de laatste centrifuge-stap niet 20 minuten maar 90 minuten zouden laten duren? Zou dit het resultaat (de geschatte dichtheden) beïnvloeden?

3.6 Referenties

Svedberg, T. (1927), 'The ultracentrifuge', Nobel Lecture, May 19.
http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1926/

Anderson, N. G. (1955), 'Studies on isolated cell components : VII. A reexamination of the preparation and properties of rat liver homogenates', *Experimental Cell Research* **8**(1), 91—100.
PubMed ID: 14372987

De Duve, C. & Beaufay, H. (1981), 'A short history of tissue fractionation', *J. Cell Biol.* **91**(3), 293s—299.
DOI: 10.1083/jcb.91.3.293s

Pertoft, H. (2000), 'Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **44**(1-2), 1—30. DOI: 10.1016/S0165-022X(00)00066-X

Lebowitz, J.; Lewis, M. S. & Schuck, P. (2002), 'Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review', *Protein Sci* **11**(9), 2067-2079. DOI: 10.1110/ps.0207702

GE Healthcare (2007), 'Cell Separation Media, Methodology and applications' (Handbook 18-1115-69 AD 2007-05). <http://www.gelifesciences.com>

4. Gelfiltratie-chromatografie

4.1 Inleiding

In proef 3 wordt scheiding van deeltjes op basis van centrifugatie beschreven. Dat werkt goed voor relatief grote deeltjes zoals cellen, organellen of virussen. Maar hoe gaan we te werk als we moleculen in een oplossing van elkaar willen scheiden? Met een ultracentrifuge is het wel mogelijk om oplossingen te scheiden tot op het niveau van macromoleculen, maar dit is een vrij tijdrovend proces. Vaak gebruiken we daarom *chromatografie*, een verzameling van relatief eenvoudige en snelle methodes voor het scheiden van moleculen in een oplossing.

De chromatografische methode die we in dit practicum zullen behandelen is gelfiltratie, ook wel bekend als *size exclusion chromatography* (SEC) of *gel permeation chromatography* (GPC). Bij gelfiltratie wordt een oplossing door een kolom met minuscule gel-korrels gespoeld. Daarbij worden moleculen in de oplossing gescheiden op basis van grootte, omdat grote moleculen sneller door de kolom migreren dan kleine. Hoewel de scheidingsresolutie van gelfiltratie lang niet zo goed als die van elektroforese (zie proef 6), heeft de techniek als voordeel dat ze snel en extreem eenvoudig is. Gelfiltratie is geschikt om vrij grote hoeveelheden mengsel-oplossing snel te scheiden in fracties met een verschillende molecuulmassa. Op die manier kan ook snel de massa van onbekende moleculen bepaald worden. Scheiding kan plaatsvinden met verschillende oplosmiddelen en buffers, en bij iedere pH. Vergeleken met elektroforese kan gelfiltratie gebruikt worden voor het scheiden van veel meer typen moleculen. Bovendien blijven bijvoorbeeld eiwitten en eiwitcomplexen in principe intact tijdens deze scheiding,

In deze proef zullen we gelfiltratie gebruiken voor een eenvoudige *protein purification*, het scheiden van een mengsel in losse eiwit-fracties. Vervolgens zullen we de molecuulmassa bepalen van enkele van de eiwitten.

4.2 Achtergrond en theorie

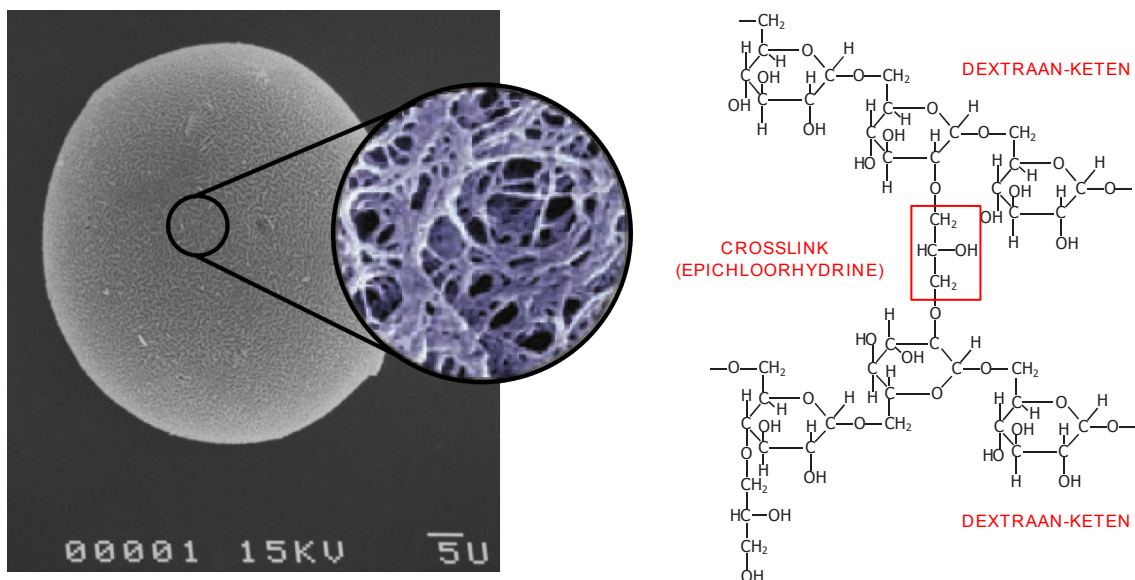
Chromatografie betekent letterlijk “schrijven met kleur”, omdat de methode als eerste gebruikt werd om de samenstelling van bladgroen te onderzoeken. Er zijn tegenwoordig veel soorten chromatografie, en de meesten hebben niets meer met kleur te maken. Maar alle chromatografie-methodes berusten op hetzelfde principe: differentiële affiniteit voor een vaste fase ten opzichte van een mobiele fase. Dat wil zeggen, de te scheiden stoffen zijn meestal opgelost in een *mobiele fase* (bijvoorbeeld water of een oplosmiddel) en worden langs of door een *vaste fase* (vaste stof of vloeistof) geleid. De vaste fase wordt ook wel *stationaire fase* genoemd. Sommige stoffen kunnen tijdelijk aan de vaste fase binden of er in oplossen, waardoor ze vertraagd worden ten opzichte van andere stoffen. De oudste en waarschijnlijk bekendste vorm is papierchromatografie, waarbij de vaste fase bestaat uit papiervezels, of uit het dunne waterlaagje dat gebonden is aan de papiervezels.

Gelfiltratie is een vorm van *partitie-chromatografie*. Dit houdt in dat de vaste en de vloeibare fase beiden vloeistoffen zijn. Scheiding is gebaseerd op partitionering (verdeling) van moleculen tussen deze twee vloeistoffen. Deze partitionering kan bijvoorbeeld het gevolg zijn van oplosbaarheidsverschillen, sommige stoffen lossen beter op in de 'vaste' fase dan anderen, en zullen dus minder snel getransporteerd worden door de vloeibare fase. In traditionele partitie-chromatografie werd de 'vaste fase'-vloeistof meestal vastgehouden door bijvoorbeeld cellulosevezels, silica-gel of zetmeelkorrels.

In 1948 beschreven Stanford Moore & William H. Stein een reeks experimenten voor het scheiden van aminozuren met behulp van partitie-chromatografie op een kolom met zetmeelkorrels. Tot verbazing van de onderzoekers gedroeg de zetmeel-kolom zich compleet anders dan cellulose of silica-gel. De volgorde waarin de aminozuren uit de kolom kwamen leek

weinig te maken te hebben met hun relatieve oplosbaarheid in de twee gebruikte fases. Bovendien was de resolutie veel hoger dan verwacht, bleken oplosmiddelen (anders dan water) niet nodig, en leek de scheiding vrijwel onafhankelijk van concentratie en pH. Pas in 1955 kwamen twee Britse medische onderzoekers, G. H. Lathe en C. R. J. Ruthven met een verklaring voor het eigenaardige gedrag van de zetmeel-kolom. Scheiding in de kolom vindt niet plaats op basis van oplosbaarheidsverschillen, maar op basis van molecuul-grootte. Kleine moleculen kunnen makkelijker doordringen in de zetmeelkorrels dan grote, en worden dus later uit de kolom gespoeld. Een probleem met zetmeel is echter dat het interacties aan gaat, met name met geladen moleculen. Deze interacties kunnen zorgen voor een extra vertraging of versnelling, en beïnvloeden dus de scheiding. De oplossing voor dit probleem kwam in 1959, met de introductie van een nieuw materiaal genaamd Sephadex.

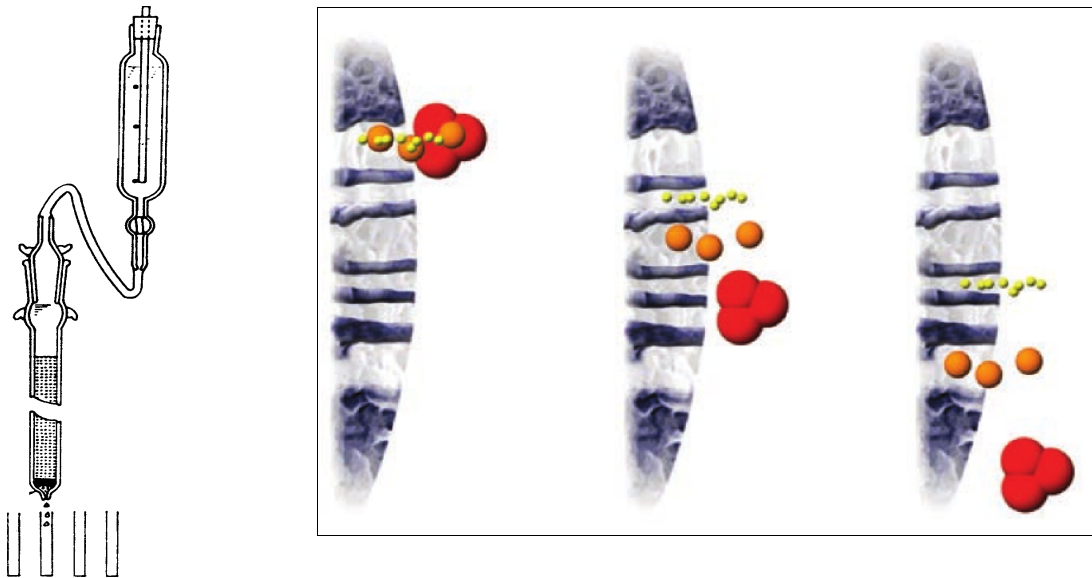
Sephadex staat voor **S**eparation, **P**harmacia **D**extran. Het is een merknaam voor minuscule bolletjes van dextraan, een glucose-polymeer (polysaccharide) geproduceerd door bacteriën. Dextraan was oorspronkelijk een afvalproduct bij de verwerking van suikerbieten, maar tegenwoordig heeft het belangrijke medische toepassingen. Het wordt onder meer gebruikt voor het helpen genezen van wonden, als bloedverdunner, als plasma-vervanger en als ionenwisselaar in geneesmiddelen. Sephadex-bolletjes bestaan uit dextraan-ketens met dwarsverbindingen van epichloorhydrine. Hierdoor ontstaat een netwerk-structuur, die vele malen zijn eigen gewicht op kan nemen aan water. Net als zetmeelkorrels kan het dus gebruikt worden om moleculen te scheiden op grootte. Maar in tegenstelling tot zetmeel is Sephadex-gel vrijwel inert, en gaat het dus niet makkelijk interacties aan met opgeloste moleculen. Aan het eind van de jaren '50 werd deze toepassing van dextraan voor partitie-chromatografie ontdekt door de Zweedse onderzoekers Per Flodin en Jerker Porath. Flodin was werkzaam bij het bedrijf Pharmacia (sinds 2004 eigendom van GE Healthcare), en in 1959 bracht dit bedrijf Sephadex op de markt. Tegelijkertijd publiceerden Porath & Flodin de gelfiltratie-methode in Nature.



Figuur 4.1 Een Sephadex-korrel, en een uitvergroting van het netwerk van dextraan-ketens met dwarsverbindingen van epichloorhydrine.

Het grote voordeel van gelfiltratie boven andere scheidingsmethodes uit die tijd was eenvoud en snelheid. De scheiding gebeurt door het te scheiden mengsel op te brengen op een kolom gevuld met verzadigde Sephadex-bolletjes. Vervolgens wordt het mengsel door de kolom gespoeld (*geëluëerd*) met een oplosmiddel (*elutievlloeistof* of *eluent*, in chromatografie-termen). Onderaan de kolom wordt het eluent in constante fracties opgevangen. Grote moleculen kunnen niet doordringen in de poriën van de Sephadex-bolletjes, en zullen dus als eerste door de kolom

spoelen. De kleinste moleculen diffunderen constant in en uit de poriën, en worden daardoor vertraagd. Ze zullen dus als laatste uit de kolom spoelen.

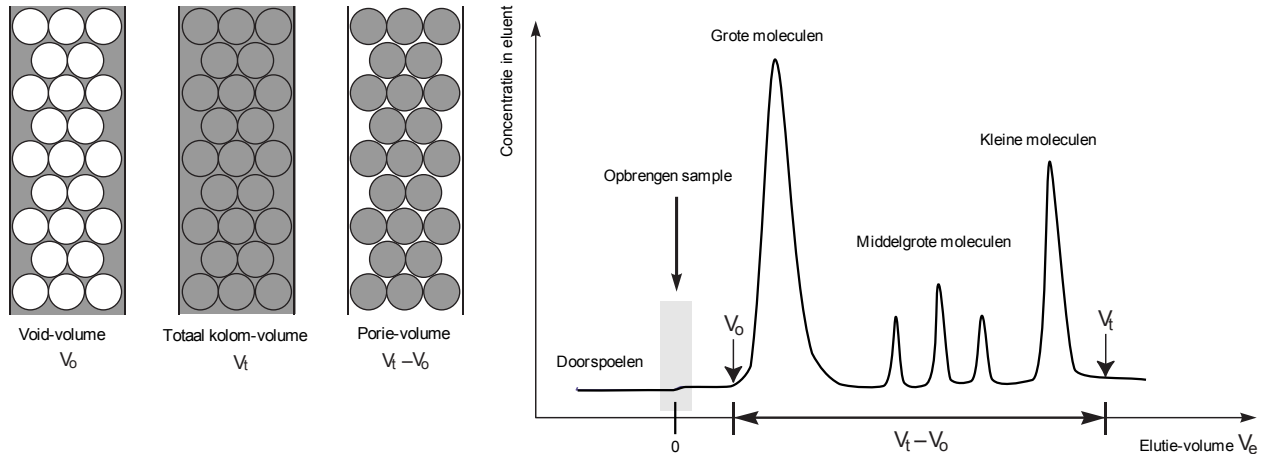


Figuur 4.2 De gelfiltratie-opstelling die werd gebruikt door Porath & Flodin in de jaren '50 en '60 (links) en een schematische voorstelling van het principe van gelfiltratie (rechts). Kleine moleculen diffunderen constant in de poriën van de gel-bolletjes, en worden daardoor vertraagd ten opzichte van grotere moleculen.

Partitie-volumes

Gelfiltratie is dus een vorm van partitie-chromatografie, waarbij de verdeling van moleculen tussen de vaste fase en de vloeibare fase afhangt van molecuulgrootte. De vaste fase bij gelfiltratie is niet dextraan, maar het volume van de elutievlloeistof dat zich in de poriën van de Sephadex-bolletjes bevindt. De vloeibare fase is het volume dat zich buiten (tussen) de bolletjes bevindt, het zogenaamde *void-volume* (V_0). Het *totaalvolume* van elutievlloeistof in de hele kolom wordt meestal aangeduid met V_t . Als we het volume van de dextraan-ketens verwaarlozen, dan is het volume van de vaste fase (eluent in de bolletjes) dus $V_t - V_0$.

Het *elutie-volume* V_e van een fractie geeft aan hoeveel elutievlloeistof er in totaal door de kolom gespoeld is, op het moment dat de fractie werd opgevangen. Een opgeloste stof met een bepaalde molecuulgrootte heeft een bepaald elutie-volume nodig om uit de kolom gespoeld te worden.



Figuur 4.3 Links een schematische voorstelling van de verschillende volumes (grijs) in een kolom met gel-bolletjes. Rechts een *chromatogram* of *elutie-profiel*, waarin de concentraties van stoffen in het eluent zijn uitgezet tegen het elutie-volume. Voor het detecteren van eiwit-pieken wordt meestal UV-absorptie bij 280 nm gebruikt (zie ook proef 5). Zouten kunnen gedetecteerd worden door geleidbaarheid te meten, en zuren en basen aan de hand van pH.

Availability-coefficient

Aan de hand van het elutie-volume, het void-volume en het totaalvolume is het mogelijk om voor iedere opgeloste stof een zogenaamde partitie-coëfficiënt te definiëren. Deze coëfficiënt geeft de relatieve hoeveelheid opgeloste stof die zich in Sephadex-bolletjes bevindt, ten opzichte van de hoeveelheid die zich buiten de bolletjes bevindt. Of anders gezegd, de coëfficiënt geeft de fractie van het volume in de Sephadex-bolletjes dat beschikbaar is voor moleculen van een bepaalde grootte. Daarom wordt het ook wel de beschikbaarheids-coëfficiënt (*availability coefficient*) genoemd:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Bij een waarde van $K_{av} = 0$ zijn moleculen te groot voor de Sephadex-poriën, en bevinden ze zich dus in het void-volume buiten de bolletjes. Deze moleculen komen als eerste uit de kolom, zodra het void-volume doorgespoeld is, dus als $V_e = V_0$.

Bij een waarde van $K_{av} = 1$ zijn moleculen zo klein dat alle poriën beschikbaar zijn, en diffunderen de moleculen dus constant in de bolletjes. Om deze kleinste moleculen uit de kolom te spoelen moet de kolom helemaal doorgespoeld worden, dus $V_e = V_t$.

Bij K_{av} -waardes tussen 0 en 1 kunnen de moleculen in een deel van de poriën doordringen, maar niet in allemaal. Deze stoffen zullen zich dus in tussenliggende fracties bevinden. Hieruit wordt meteen duidelijk dat het belangrijk is om de porie-groottes goed te kiezen voor de te scheiden stoffen. Als de poriën te klein zijn dan komen alle stoffen samen terecht in de laatste fractie. En als de poriën te groot zijn dan komen ze allemaal in de eerste fractie. In beide gevallen vindt uiteraard geen scheiding plaats.

Gelfiltratie-media

Sephadex is verkrijgbaar in verschillende varianten en korrel-groottes. De eerste twee types die in 1959 op de markt kwamen waren G-25 en G-50. De G staat voor "Gel", en het getal geeft aan hoeveel water de gel vast kan houden. Minder dwarsverbindingen tussen de dextraan-ketens betekent grotere poriën, en dat zorgt ervoor dat de gel meer water opneemt. De originele Sephadex G-25 nam 2.5 gram water op per gram droog poeder, G-50 nam 5.0 gram water op, enzovoort.

Sephadex type	Te scheiden molecuulmassa-range (voor globulaire eiwitten)	Eindvolume na zwellung (in ml per g drooggewicht)	Zweltijd benodigd bij 20/90°C (uur)	Maximaal toepasbare druk (bar)
G-10	tot 700 Da	2–3	3 / 1	
G-15	tot 1500 Da	2.5–3.5	3 / 1	
G-25	1000–5000 Da	4–6	3 / 1	
G-50	1500–30000 Da	9–11	3 / 1	
G-75	3–80 kDa	12–15	24 / 3	0.16
G-100	4–150 kDa	15–20	72 / 5	0.096
G-150	5–300 kDa	20–30	72 / 5	0.036
G-200	5–600 kDa	30–40	72 / 5	0.016

Sephadex G-150 en G-200 worden sinds kort niet meer geproduceerd. De voornaamste reden is dat deze bolletjes een dusdanig losse structuur hadden dat de doorloopsnelheid beperkt moest blijven. Bij een te hoge druk zouden de bolletjes teveel samengedrukt worden, wat de poriegroottes en dus de resultaten zou beïnvloeden. Om die reden worden voor het scheiden van grotere moleculen tegenwoordig ook andere gel-vormende materialen samen met dextraan gebruikt. De meest gebruikte polymeren hiervoor zijn bisacrylamide en agarose, beiden ook toegepast in elektroforese-gels (zie proef 6). Bolletjes van deze materialen voor gelfiltratie worden verkocht onder merknamen als Sephacryl en Superose.

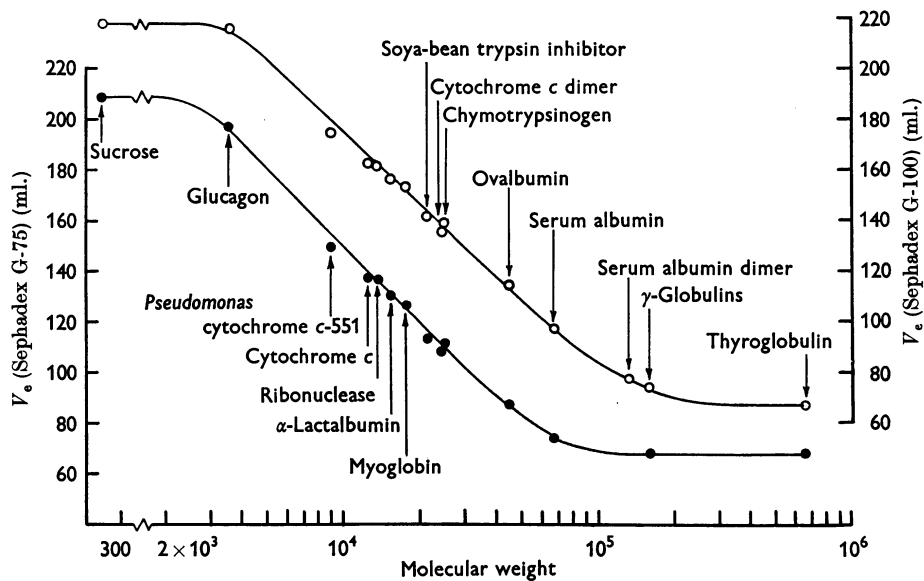
De “G”-typen Sephadex zijn alleen geschikt voor waterige elutie-vloeistoffen. Sephadex LH-20 is een afgeleide van G-25 met hydroxypropyl-groepen aan de dextraan-ketens. Hierdoor kan het zowel gebruikt worden voor waterige oplossingen als voor polaire organische oplosmiddelen.

Hoewel Sephadex nog steeds veel gebruikt wordt, adviseert de fabrikant tegenwoordig Superdex, een mengsel van aan elkaar gebonden dextraan- en agarose-polymeren. Dit medium geeft een enigszins betere scheiding dan de originele Sephadex-bolletjes. Voor een grotere scheidings-range wordt Sephacryl aangeraden, een mengsel van dextraan- en bisacrylamide-polymeren. Met de huidige media is gelfiltratie geschikt voor het scheiden van moleculen in de range van ongeveer 100 Da (bijvoorbeeld peptides) tot 80,000,000 Da (grote eiwitcomplexen).

Molecuulmassa en selectiviteitscurves

De hierboven genoemde range voor scheiding van moleculen is op basis van molecuulmassa. Echter, gelfiltratie scheidt moleculen niet op basis van massa maar op basis van grootte (*hydrodynamisch volume* of *gyratie-radius*). Uiteraard is er wel een verband tussen grootte en massa, immers grotere moleculen bevatten meer atomen en zijn dus vaak ook zwaarder. Maar het verband is enigszins afhankelijk van het type molecuul. Grootte wordt namelijk niet alleen bepaald door het aantal atomen, maar ook door de vorm van het molecuul. Lange ketens zullen zich bijvoorbeeld anders gedragen dan een gevouwen eiwit, ook al zouden beiden hetzelfde aantal atomen hebben. Ook de samenstelling van het molecuul is belangrijk, atomen hebben immers verschillende massa's.

Binnen de verschillende klassen moleculen (peptides, globulaire eiwitten, fibreuze eiwitten, nucleinezuren, polysacchariden, lipiden, etc.) is het verband tussen massa en grootte wel min of meer lineair. Het verband tussen grootte van een molecuul en de migratie-snelheid door een gelfiltratie-kolom is niet lineair maar min of meer logaritmisch. Dat wil zeggen, de migratie-snelheid neemt sneller af met grootte voor kleine moleculen dan voor grotere moleculen. Zoals gezegd geeft het elutie-volume V_e van een stof aan hoe lang het duurt voordat de stof uit de kolom elueert. Als we V_e van een aantal bekende moleculen meten en uitzetten tegen de molecuulmassa M (op een logaritmische schaal), krijgen we een sigmoïde curve (figuur 4.4.).

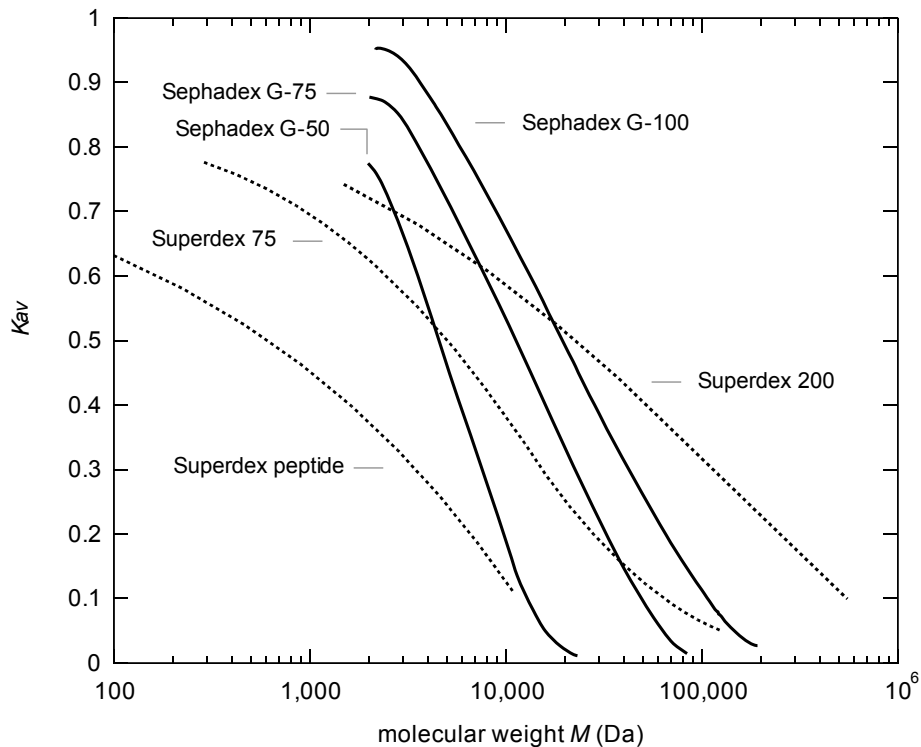


Figuur 4.4 Het elutie-volume van enkele bekende eiwitten over een gelfiltratie-kolom met Sephadex G-75 (onderste curve) en G-100 (bovenste curve) uitgezet tegen molecuulmassa.
 Uit: Andrews, *Biochem. J.* (1964) **91**, 225.

Het middelste deel van de curves is recht, dus over een grote range van molecuulmassa's is er een lineair verband tussen elutie-volume en $\log M$. Echter, het elutie-volume is uiteraard ook afhankelijk van het kolom-volume, wat het moeilijk maakt om verschillende kolommen met elkaar te vergelijken. Daarom gebruiken we meestal de eerder genoemde beschikbaarheidscoëfficiënt K_{av} . Deze fungeert als een maat voor de snelheid waarmee moleculen door de kolom migreren, genormaliseerd naar het volume van de gebruikte kolom. De relatie tussen K_{av} en molecuulmassa wordt wel een *selectiviteitscurve* genoemd (figuur 4.5).

Een selectiviteitscurve is specifiek voor een klasse moleculen en het gebruikte gelfiltratiemedium, en is ook enigszins afhankelijk van de gebruikte oplosmiddelen of buffers en de pakking van gel-korrels in de kolom. Een steile curve betekent dat een goede scheidingsresolutie mogelijk is, maar slechts over een beperkt bereik van molecuulmassa's. Een brede curve betekent dat moleculen over een groot bereik van massa's gescheiden kunnen worden, maar met een lagere resolutie. Voor het kiezen van een geschikt gelfiltratiemedium is het dus belangrijk om rekening te houden met de selectiviteitscurves van de verschillende media. Als een gelfiltratie-kolom gebruikt wordt voor het bepalen van molecuulmassa's is het bovendien aan te raden om de kolom eerst te ijken. Hierbij bepaal je de selectiviteitscurve van de kolom aan de hand van een set marker-moleculen met een bekende massa.

De hoeveelheid te scheiden oplossing en de verhouding tussen de lengte en breedte van een kolom is mede bepalend voor de resolutie van de scheiding. Voor groffe scheidingen in enkel een hoogmoleculaire en een laagmoleculaire fractie (*groepscheiding*) kan per keer tot 30% van het kolom-volume aan oplossing gescheiden worden. Voor hoge-resolutie scheidingen in meerdere fracties kan per keer echter niet veel meer dan 0.5-4% van het kolomvolume gebruikt worden. Fijnere gel-korrels en een langere kolom geven een betere scheidingsresolutie, maar zorgen ook voor een langere scheidingstijd. Hogere druk, een kortere kolom en grotere gel-korrels versnellen het scheidingsproces, maar gaan ten koste van de resolutie.



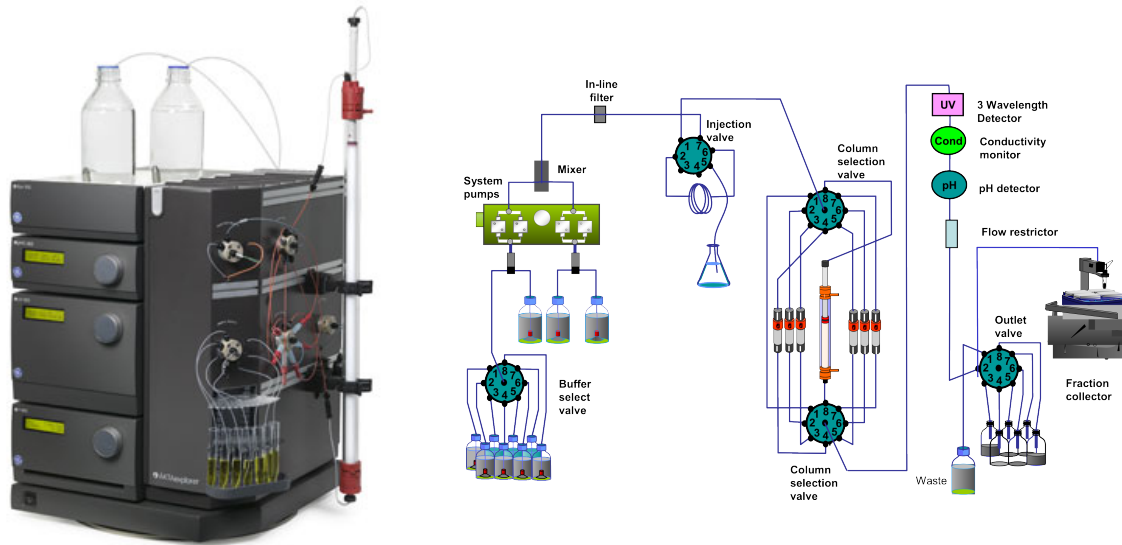
Figuur 4.5 Selectiviteitscurves voor globulaire eiwitten op verschillende gelfiltratie-media.

Moderne toepassingen

Gelfiltratie is een ideale techniek voor snelle scheidingen waarbij een hoge resolutie niet erg belangrijk is. Eenvoudige Sephadex gelfiltratie-kolommen worden nog steeds veel gebruikt, vooral voor groepsscheiding. Een voorbeeld is ontzouting, waarbij een oplossing gescheiden wordt in een fractie met grote macromoleculen zoals eiwitten, en een fractie met kleine moleculen zoals ionen. Andere veel gebruikte toepassingen van groepsscheiding zijn het verwijderen van organische zuren of kleurstoffen uit een oplossing, en het scheiden van losse nucleotiden en nucleotide-ketens bij DNA sequencing.

Voor meer precieze gelfiltratie-scheidingen en -bepalingen wordt in laboratoria tegenwoordig meestal automatische apparatuur gebruikt. Deze apparaten meten vaak ook de licht-absorptie, geleidbaarheid en pH van het eluent, en geven dit weer in een elutie-profiel. Als bijvoorbeeld de UV-absorptie bij 280 nm gemeten wordt, is direct zichtbaar in welke elutie-fracties zich eiwitpieken bevinden.

De term gelfiltratie wordt meestal gebruikt voor scheiding op molecuulgrootte (size-exclusion chromatography). Echter, gel-korrels op basis van dextraan of andere polymeren kunnen ook gebruikt worden voor scheiding op andere eigenschappen, zoals lading, bindings-affiniteit voor antigenen, interacties met (metaal)ionen, enzovoort. Hoewel we deze geavanceerde typen gel-chromatografie hier niet verder zullen behandelen zijn dergelijke methodes onmisbaar voor modern biologisch en medisch onderzoek (zie ook Voet, Voet en Pratt, section 5.2). Vaak wordt een combinatie van kolommen met verschillende media gebruikt voor het scheiden van oplossingen op basis van verschillende eigenschappen. Bekende voorbeelden hiervan zijn *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) en *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC).



Figuur 4.6 Een modern automatisch gelfiltratie-apparaat met een kant-en-klare Superdex-kolom.

4.3 Over de proef

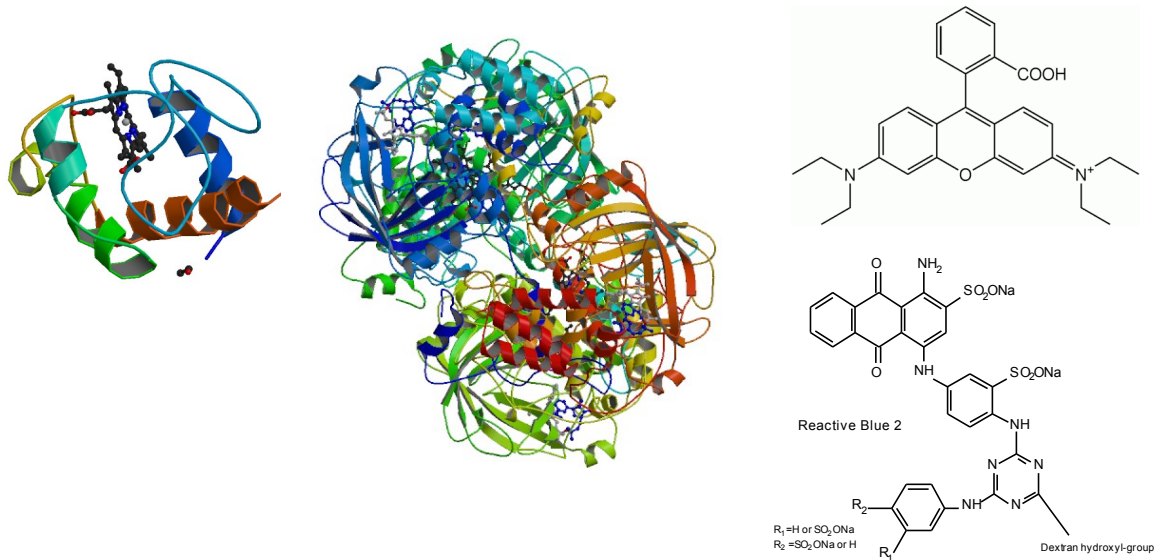
Met behulp van Sephadex G-50 gelfiltratie gaan we een oplossing scheiden in losse eiwit-fracties. Aan de hand van de elutie-volumes van de stoffen bepalen we het void-volume en het totaalvolume van de kolom, en de beschikbaarheids-coëfficiënt en de molecuulmassa van de eiwitten. De te scheiden oplossing is een mengsel van cytochroom c, katalase, rhodamine B en dextraanblauw 2000.

Cytochroom c is een ijzerhoudend eiwit dat voorkomt in veel eencelligen, en in de mitochondriën van alle dieren, planten en schimmels. Het is een sterk geconserveerd eiwit, en is essentieel voor elektron-transport in de ademhalingsketen van eukaryote cellen. Vanwege de heem-groep heeft het eiwit in oplossing een rood-oranje kleur (zie proef 1).

Katalase is een enzym dat de afbraak katalyseert van waterstofperoxide (H_2O_2) in water en zuurstof. Waterstofperoxide is een schadelijk bijproduct van veel metabolische processen. Katalase komt daarom voor in alle dierlijke cellen, de meeste planten en ook in veel aerobe prokaryote cellen. Het bevindt zich bij planten en dieren gewoonlijk in celorganellen genaamd peroxisomen. Het enzym heeft een extreem hoge activiteit, een molecuul katalase kan per seconde miljoenen H_2O_2 -moleculen splitsen. Het eiwit is een tetrameer van vier subunits die allemaal ongeveer even groot zijn, en valt makkelijk uiteen in losse delen. Katalase is kleurloos in oplossing, maar kan makkelijk gedetecteerd worden door toevoeging van waterstofperoxide. Vanwege de vorming van zuurstof zal de oplossing gaan bruisen.

Rhodamine B is een rood-fluorescerende kleurstof die onder meer gebruikt wordt als label-kleurstof in fluorescentie-microscopie en immunologische assays (bijvoorbeeld ELISA). Het wordt ook gebruikt in sommige rode lasers en glow-sticks, als tracer in hydrologisch onderzoek, en om Mycobacteriën te identificeren. Rhodamine is een relatief klein molecuul van 479.02 Da. Het is giftig en is in oplossing felroze. Omdat het klein is en goed zichtbaar, kunnen we rhodamine gebruiken om het totaalvolume V_t van de gelfiltratie-kolom te bepalen.

Dextraanblauw 2000 is een hoog-moleculaire markerstof die bestaat uit een dextraan-polymeër gekoppeld aan de blauwe textielkleurstof reactive blue 2. Vanwege de grote molecuulmassa van 2000 kDa wordt het veel gebruikt om het void-volume V_0 van een gelfiltratie-kolom te bepalen.



Figuur 4.7 De structuur van cytochroom c (1hrc), katalase (4blc), rhodamine B en de gekleurde reactive blue 2 groep van dextraanblauw.

We gebruiken voor deze proef een eenvoudige gelfiltratie-opstelling, vergelijkbaar met de oorspronkelijke opstelling van Porath & Flodin. Een taps-toelopende glazen buis wordt bevestigd aan een statief. De buis eindigt in een plastic slang die wordt afgesloten met een hoffmanklem. Onderin de buis doen we een prop aquariumwatten en een laagje glaspereels, om te zorgen dat de Sephadex-gel niet uit de buis loopt. De Sephadex G-50 suspensie is al gezwollen in een 0.005 M kaliumfosfaat-buffer (pH 6.3), en wordt voorzichtig op de glaspereels gegoten. Tijdens deze “pakking” van de kolom met Sephadex-suspensie loopt de buffer eruit en klinkt de kolom in. De Sephadex-kolom moet echter altijd onder vloeistof blijven, anders droogt de kolom uit en ontstaan er barsten die de scheiding verstoren. Om dezelfde reden moet het vormen van luchtbellen voorkomen worden. Tijdens de proef blijven we buffer toevoegen, zodat de te scheiden oplossing door de kolom gespoeld wordt. Het eluent wordt opgevangen in glazen buisjes, in constante fracties van 1.5 ml.

Na de proef wordt de Sephadex weer verzameld voor hergebruik. De gel-suspensie kan (na schoonspoelen) lang bewaard worden in 20% ethanol, of met toevoeging van 0.02% natriumazide (NaN₃, giftig) om bacteriegroei tegen te gaan.

4.4 Handleiding

Benodigheden

- 300 ml 0.005 M kaliumfosfaat-elutiebuffer (pH 6.3), bestaande uit 5.4 g KH_2PO_4 en 2.24 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ per liter demiwater
- Sephadex G-50 medium in 0.005 M kaliumfosfaat-buffer
- 30% waterstofperoxide (H_2O_2)
- 100 ml monsteroplossing, met daarin:
 - 1 mg rhodamine B (**giftig**)
 - 0.2 g dextraanblauw 2000
 - 4.3 ml katalase
 - 0.3 g cytochroom c
 - 5% glucose
- kolom, statief, slang, hofmannklem, aquariumwatten, glasparels
- automatische pipet, glaspipet
- een rekje met ongeveer 50 glazen buisjes van 2 ml
- trechter, bekersglas, zeef, liniaal

Vorbereiding

Eerst gaan we de gelfiltratie-kolom prepareren:

- Zet de glazen kolom vast in de statiefklem. Zorg dat de kolom recht hangt en dat de klem in het midden zit.
- Bevestig een hofmannklem aan het slangetje. De schroef van de klem moet op het midden van de slang zitten, anders is de slang niet goed af te sluiten. Draai de klem nog niet dicht.
- Duw voorzichtig een propje aquariumwatten (1.5-2 cm) onderin de kolom met een glaspipet.
- Giet een dun laagje glasparels op de watten, zodat een mooi glad oppervlak ontstaat.
- Homogeniseer voorzichtig de fles Sephadex-suspensie door te zwenken.
- Zet een bekersglas onder de kolom, om bufferoplossing op te vangen.
- Giet de Sephadex-suspensie in één keer via een trechtertje in de kolom. Dit moet vloeiend maar langzaam gebeuren, anders ontstaan er luchtballen.
- Let op dat er geen ongelijkheden of fronten ontstaan in de kolom. Deze kunnen eventueel verwijderd worden door *heel voorzichtig* met een glaspipet te roeren.
- Laat de buffer wegdruppelen uit de kolom en controleer of er geen Sephadex wegglekt.

- Blijf bovenin de kolom voorzichtig elutiebuffer toevoegen met een pipet. De kolom mag niet droog komen te staan!
- De kolom klinkt in omdat de buffer eruit loopt. Blijf Sephadex toevoegen totdat de kolom een hoogte heeft van ongeveer 20 cm (zie markering op de glaskolom).
- Spoel de kolom voor het begin van de proef een keer door met elutiebuffer. Draai daarna het klemmetje dicht.
- Nummer 50 glazen buisjes en zet ze in een rekje.

Werkwijze gelfiltratie

Als de kolom gereed is kunnen we de monsteroplossing opbrengen en elueren:

- Pipetteer met een automatische pipet *voorzichtig* 0.4 ml monsteroplossing onder de buffer, net boven de Sephadex. Let op dat het gel-oppervlak niet beschadigd wordt, en breng het monster gelijkmatig, voorzichtig draaiend langs de glaswand op.
- Draai het klemmetje onderaan de buis open en vang de druppels op.
- Per buisje wordt 1.5 ml eluent opgevangen (dat is tot de rand van het rekje), daarna schuif je door naar het volgende buisje.
- Blijf bovenaan de kolom voorzichtig elutiebuffer toevoegen.
- Ga door met elueren totdat alle kleur uit de kolom is verdwenen.

Afronding

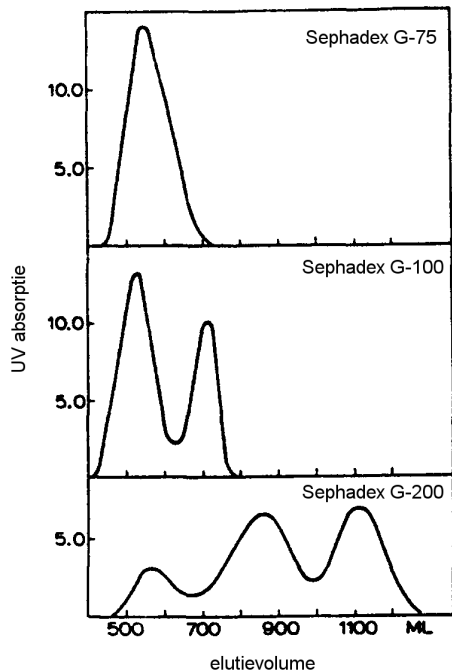
- Bepaal in welke buisjes de pieken van de verschillende componenten zich bevinden. Voor rhodamine, dextraanblauw en cytochroom c kun je dit doen aan de hand van kleur. De bepaling voor katalase kun je doen door aan iedere buis een druppel waterstofperoxide toe te voegen.
- Meet en noteer de hoogte van de Sephadex in de kolom.
- Spoel de kolom door met veel elutiebuffer.
- Haal de kolom uit de statiefklem, en giet de Sephadex, de glasparsels en de watten in een bekersglas. Je kunt dit doen door voorzichtig het slangetje tegen de persluchtkraan te zetten.
- Gooi de aquariumwatten weg, en giet de Sephadex en glasparsels door een zeef. Giet de Sephadex terug de fles. Spoel de glasparsels af, droog ze met een tissue en doe ze terug in het daarvoor bestemde buisje.
- Rhodamine is giftig, dus buisjes met rhodamine moeten in het daarvoor bestemde afvalvat. Overige buisjes mogen gelegeerd worden in de gootsteen.
- Spoel al het glaswerk af en ruim het op.

Uitwerking

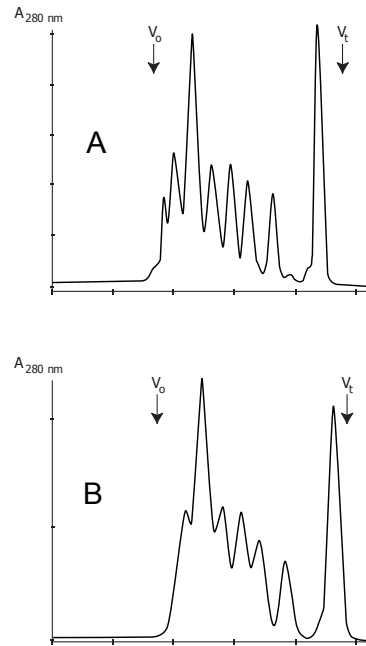
- Bepaal van alle componenten het elutievolume V_e . Dit is het volume elutiebuffer dat nodig was om de betreffende component uit de kolom te spoelen.
- Bepaal het void-volume V_0 en het totaalvolume V_t van deze kolom aan de hand van de resultaten van dextraanblauw en rhodamine.
- Bereken de partitie- of beschikbaarheids-coëfficiënten K_{av} van cytochroom c en katalase.
- Gebruik een selectiviteitscurve uit figuur 4.5 om de molecuulmassa van cytochroom c en katalase te schatten.
- Zorg dat alle resultaten genoteerd zijn in het labjournaal.

4.5 Vragen

1. Welk eiwit is groter, cytochroom c of katalase? Komt dit overeen met wat je weet van de functie en structuur van deze eiwitten?
2. Is er iets eigenaardigs te zien aan de resultaten van katalase? Zo ja, verklaar dit.
3. Verzin een manier om de molecuulmassa van rhodamine te kunnen bepalen.
4. Hoe zou je twee verschillende eiwitten kunnen scheiden die ongeveer even groot zijn?
5. De gebruikte kolom had een doorsnede van 1.7 cm. Bereken het volume van de Sephadex-kolom aan de hand van de doorsnede en de hoogte. Vergelijk dit met de waarde van V_t die je hebt afgeleid met behulp van rhodamine, komen de volumes overeen?
6. Figuur 4.8 (zie volgende pagina) geeft het elutie-profiel van runder-plasma op drie verschillende Sephadex-media. Verklaar de verschillen tussen de drie curves.
7. Figuur 4.9 (zie volgende pagina) geeft het elutie-profiel van dezelfde oplossing op hetzelfde gelfiltratie-medium, onder twee verschillende experimentele omstandigheden. Wat is het verschil tussen de twee curves? Welke van de twee runs zal een betere scheiding opleveren? Noem mogelijke oorzaken voor dit verschil. (Hint: als je er niet uit komt, lees nog eens het gedeelte over “*Molecuulmassa en Selectiviteitscurves*” in de achtergrond-tekst.)



Figuur 4.8 Het elutie-profiel van runderbloedplasma op drie verschillende Sephadex-media. Naar: Flodin, *Polymer Engineering & Science* (1998) **38**, 1226



Figuur 4.9 Elutie-profielen van hetzelfde mengsel op hetzelfde medium, maar onder verschillende omstandigheden.

4.6 Referenties

Moore, S. & Stein, W. H. (1948), 'Partition Chromatography of Amino Acids on Starch', *Annals of the New York Academy of Sciences* **49**, 265–278. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1948.tb35255.x

Lathe, G. H. & Ruthven, C. R. (1956), 'The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water.', *Biochem J* **62**(4), 665–674. Pubmed-ID: 13315231

Porath, J. & Flodin, P. (1959), 'Gel filtration: a method for desalting and group separation.', *Nature* **183**(4676), 1657–1659.

Andrews, P. (1964), 'Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration.', *Biochem J* **91**(2), 222–233. Pubmed-ID: 1202876

Janson, J. (1987), 'On the history of the development of Sephadex®', *Chromatographia* **23**(5), 361–365. DOI: 10.1007/BF02316183

Flodin, P. (1998), 'The Sephadex story', *Polymer Engineering & Science* **38**(8), 1220–1228. DOI: 10.1002/pen.10291

GE Healthcare (2007), 'Gel Filtration, Principles and Methods' (Handbook 18-1022-18 AJ 01/2007). <http://www.gelifesciences.com/protein-purification>

Voet, Voet & Pratt, 'Fundamentals of Biochemistry', 3rd edition, Section **5-2C** (*Chromatography*), Section **18-4B** (*Aerobic Metabolism Has Some Disadvantages*)

5. Eiwitbepaling

5.1 Inleiding

In veel gevallen is het nodig om te weten wat de concentratie van eiwitten is in een monster. Voor het uitvoeren van een scheiding moet je vaak van tevoren weten hoeveel eiwit je ongeveer hebt (bijvoorbeeld bij gelelectroforese, zie proef 6). Bovendien worden resultaten van veel fysiologische bepalingen uitgedrukt per milligram eiwit.

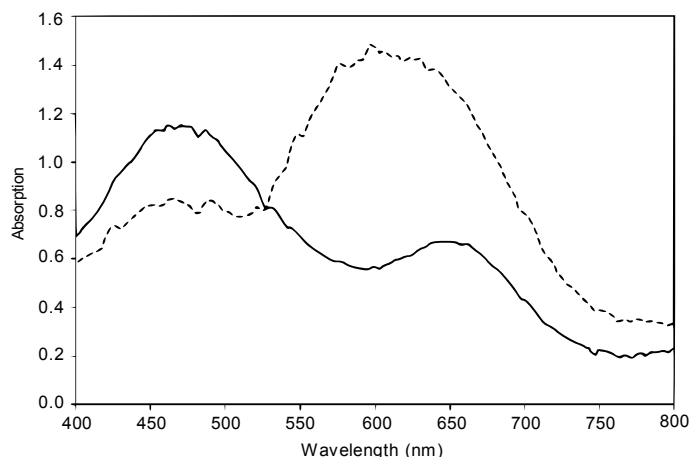
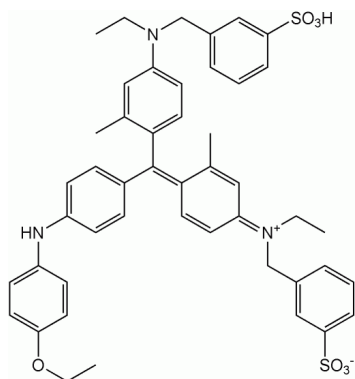
Proef 1 van deze reader behandelt colorimetrie of spectrofotometrie, een methode waarmee je de concentratie van veel opgeloste stoffen kunt bepalen aan de hand van de absorptie van licht. Dit berust op het feit dat iedere stof een absorptiespectrum heeft, vaak met karakteristieke absorptie-pieken bij bepaalde golflengtes. Enkele eiwitten hebben een duidelijk absorptiespectrum, en dus ook een karakteristieke kleur. Dit betreft de zogenaamde chromoproteïnen, zoals hemoglobine, phytochrome en een reeks andere eiwitten met metaalhoudende groepen. Het spectrum van verreweg de meeste biologische macromoleculen bevat echter geen makkelijk te meten absorptie-pieken in het zichtbare licht, en in het UV is er veel “ruis” van andere moleculen aangezien vrijwel alle organische moleculen in meer of mindere mate UV-straling absorberen.

Dus hoe gaan we te werk als we eiwit-concentratie van een oplossing willen meten? Het is niet mogelijk om dit direct te meten met een spectrofotometer, maar indirect kan het vaak wel. Er zijn bijvoorbeeld stoffen die reageren met eiwitten en daarbij een kleurverandering ondergaan. Meetmethodes die hierop gebaseerd zijn noemen we *colorimetric protein assays*.

Deze proef behandelt één van de meest gebruikte proteïne assays, de *Sedmak & Grossberg (S+G) assay* (beter bekend in literatuur als de *Bradford assay*). We zullen deze methode gebruiken om een kleurstof te binden aan drie onbekende eiwitmonsters en een serie bekende lysozymplossingen, zodat we indirect de eiwitconcentraties kunnen bepalen met een spectrofotometer (zie ook proef 1).

5.2 Achtergrond en theorie

De Bradford assay is vernoemd naar Marion M. Bradford, die de methode voor het eerst publiceerde in 1976. De werking is gebaseerd op binding van de kleurstof Coomassie Brilliant Blue G250 aan eiwitten. Coomassie Brilliant Blue was oorspronkelijk ontwikkeld als wol-verf door de Britten in de 19e eeuw, en is vernoemd naar de stad Kumasi in Ghana. De letter G in G250 staat voor “greenish”, en 250 is een maat voor de kleur-intensiteit. De kleurstof bindt aan de basische aminozuren (Arginine, Lysine, Histidine) en aromatische aminozuren (Tyrosine, Tryptophan, Phenylalanine) in eiwitten. Bij binding onder zure omstandigheden verschuift de absorptie-pek van 465-470 nm naar 595 nm. Meting van de absorptie bij 595 nm is dus een maat voor de hoeveelheid kleurstof die gebonden is aan eiwitten. Door de absorptie te vergelijken met de absorptie-waarden van bekende concentraties eiwit (een ijklijn) kan de concentratie eiwit bepaald worden.

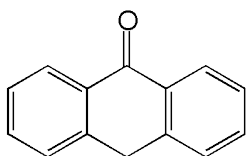


Figuur 5.1 Structuur en absorptiespectra van Coomassie Brilliant Blue G250. Een oplossing van deze kleurstof in fosforzuur (Bradford reagens) heeft een absorptiespectrum met een piek bij 470 nm (doorlopende lijn). Na binding met een eiwit (20 µg BSA) verschuift de absorptiepiek naar ongeveer 595 nm (stippellijn). Merk echter op dat ook de ongebonden kleurstof nog absorbeert bij 595 nm.

Het originele reagens van Bradford is een oplossing van Coomassie Brilliant Blue G250 in fosforzuur. De aangepaste methode van J. James Sedmak and Sidney E. Grossberg (gepubliceerd in 1977) gebruikt perchloorzuur, en is iets stabiel en gevoeliger. Coomassie Brilliant Blue wordt tegenwoordig verkocht onder de merknaam Servablue, en wordt ook veel gebruikt in andere analytische methodes zoals bijvoorbeeld gelelectroforese (zie proef 6). Naast G250 bestaat er nog een andere variant, R250 (“reddish”). Deze is gevoeliger en wordt dus meestal gebruikt als precisie belangrijk is. Het nadeel is echter dat de kleuring van eiwitten met R250 veel langer duurt.

De Bradford / S+G assay is tolerant voor hoge concentraties zouten, maar is gevoelig voor vetzuren (SDS, glycerol, Triton), en diverse andere stoffen waaronder EDTA, sucrose en fenol. Bovendien is de mate van kleuring afhankelijk van pH en van het percentage basische aminozuren (vooral Arginine) in de eiwitten. Dit percentage kan variëren tussen eiwitten, het is dus belangrijk om een enigszins vergelijkbaar referentie-eiwit te kiezen voor de ijklijn.

Indirecte colorimetrische assays worden ook gebruikt voor andere stoffen dan eiwitten. Denk bijvoorbeeld aan de bepaling van zetmeel-gehalten met jodium, en de bepaling van suikers en cellulose met anthron. Naast de Bradford / S+G assay bestaan er ook nog andere colorimetrische bepalingen voor eiwit-concentraties. De bekendste hiervan zijn Biuret, Lowry, BCA en het meten van UV extinctie. Daarnaast bestaan er assays die zijn gebaseerd op andere principes, bijvoorbeeld immunoassays.



Figuur 5.2 Anthron kan gebruikt worden als colorimetrische assay voor de meeste koolhydraten, en wordt met name gebruikt als reagens voor suikers. Het te bepalen monster wordt 10 minuten gekookt met een oplossing van anthron in zwavelzuur, en daarna wordt de absorptie bepaald bij 590-630 nm. Ook bij dit assay is een ijklijn nodig.

De Biuret, Lowry en BCA (*bicinchoninic acid*) assays berusten alledrie op de binding van koper-ionen (Cu^{2+}) aan eiwitten. De koper-ionen reageren met peptide-bindingen, waarbij het koper gereduceerd wordt tot Cu^+ . Deze ionen kunnen vervolgens direct (bij 540 nm) of indirect worden gedetecteerd. Omdat de peptide-ruggengraat deel uitmaakt van ieder eiwit zijn deze methodes minder gevoelig dan Bradford / S+G voor de exacte aminozuur-samenstelling van het te meten eiwit. Echter, omdat koper-ionen makkelijk interacties aangaan zijn ze over het

algemeen veel gevoeliger voor de aanwezigheid van andere opgeloste stoffen, inclusief diverse zouten en veel gebruikte biologische buffers zoals Tricine en TRIS. Biuret heeft bovendien moeite met het detecteren van lage eiwitconcentraties. Lowry en BCA gebruiken een indirecte bepaling voor de Cu^+ -ionen en zijn daardoor veel gevoeliger, maar relatief traag.

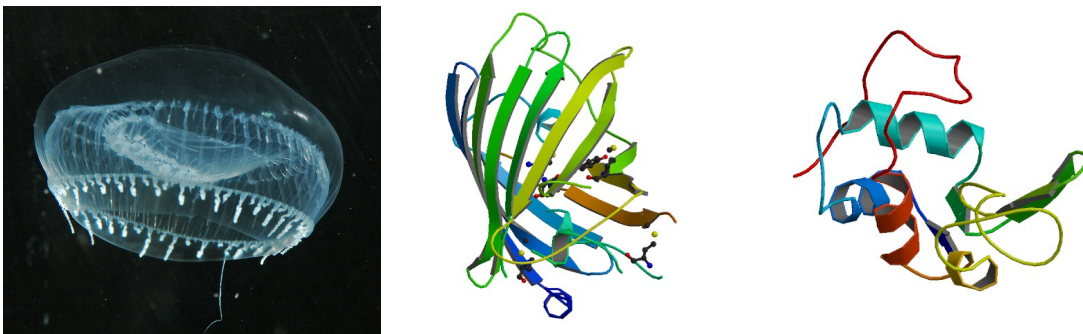
Directe bepaling van UV absorbance (zie proef 1) is de meest eenvoudige en snelle bepaling voor eiwit-gehalten, maar ook de minst exacte. De methode berust op het feit dat aromatische aminozuren over het algemeen een absorptie-piek hebben rond 280 nm. De absorptie van UV-licht is echter afhankelijk van de aminozuur-samenstelling en structuur van het te meten eiwit, en is relatief gevoelig voor verontreinigingen en variaties in pH. Vanwege de eenvoud en snelheid is het echter een nuttige methode voor ruwe schattingen van eiwit-gehalten. Het wordt bijvoorbeeld veel gebruikt om eiwit-pieken te detecteren bij chromatografische scheidingsmethodes (zie proef 4).

Immunoassays zoals ELISA berusten op binding van antilichamen aan een specifiek antigen, meestal een eiwit. Dergelijke methodes zijn veel complexer dan colorimetrische bepalingen, maar maken het mogelijk om zeer nauwkeurig en specifiek de concentratie te bepalen van één bepaald type eiwit. Immunoassays worden daarom veel gebruikt om ziektes, drugs of allergenen op te sporen, bijvoorbeeld in de test voor HIV.

5.3 Over de proef

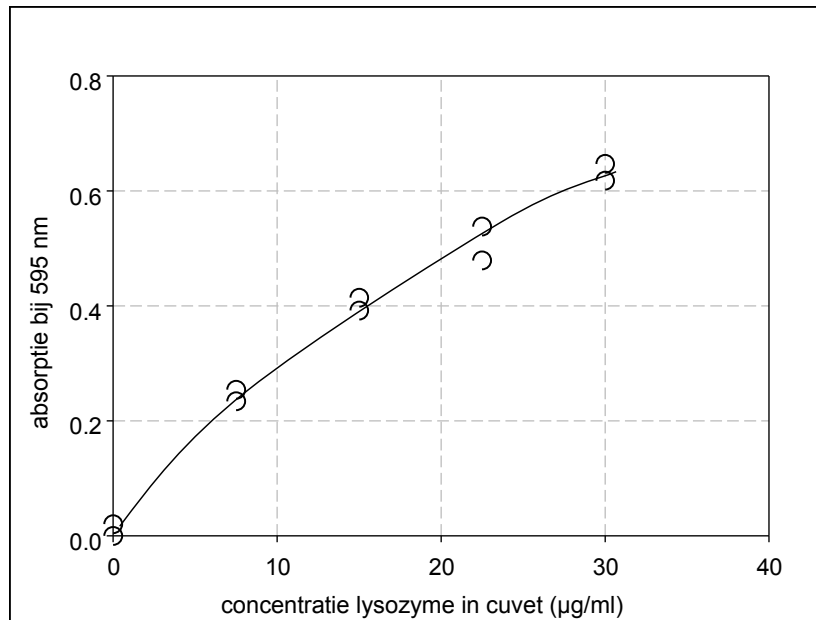
Met behulp van een S+G assay gaan we de concentratie bepalen van onbekende oplossingen van de eiwitten GFP, YFP en CFP. Voor het maken van de ijklijn meten we vier oplossingen met bekende concentraties van het eiwit lysozyme.

GFP, YFP en CFP zijn zogenaamde *fluorescent proteins*. GFP (*Green Fluorescent Protein*) is oorspronkelijk afkomstig van de lichtgevende kwal *Aequorea victoria*. Het eiwit heeft een absorptiepiek voor fotonen van 398–488 nm (UV tot blauw licht, afhankelijk van het type GFP) en staat een deel van de geabsorbeerde energie vervolgens weer af in de vorm van groen licht (fotonen van 498–509 nm). YFP en CFP werken op dezelfde manier, maar staan geabsorbeerde energie af als respectievelijk geel (yellow) en lichtblauw (cyan) licht. Dergelijke fluorescerende eiwitten zijn tegenwoordig erg belangrijk in biologisch onderzoek. Ze worden veel gebruikt als genetische *markers*. Door het corresponderende gen in te bouwen is het mogelijk om de expressie van andere genen te volgen. En bij *fluorescentiemicroscopie* maken ze het mogelijk om levende cellen of zelfs losse eiwitten te *taggen*, zodat deze individueel te volgen zijn onder “natuurlijke” (*in vivo*) omstandigheden. Ook veel immunoassays maken tegenwoordig gebruik van fluorescerende markers. De reden dat we GFP, YFP en CFP gebruiken in deze proef is omdat we in de volgende proef de oplossingen verder willen analyseren op molecuulmassa, met behulp van gelelectroforese. Zoals we zullen zien is het gebruik van fluorescerende eiwitten hiervoor erg praktisch. Voor meer informatie over fluorescentie-processen, zie proef 1.



Figuur 5.x Links de lichtgevende kwal *Aequorea victoria*, en het daaruit geïsoleerde Green Fluorescent Protein GFP (1ema). Rechts de structuur van lysozym (2lyz). In 1965 was dit het tweede eiwit en het eerste enzym waarvan de structuur werd bepaald.

Lysozyme is een eiwit dat peptidoglycaan-moleculen afbreekt, een eigenschap die het in staat stelt om de celwand van veel bacteriën kapot te maken. Het eiwit werd min of meer per ongeluk ontdekt in 1922 door de beroemde arts en bioloog Alexander Fleming, tevens de ontdekker van penicilline. Vanwege de antibacteriële werking is lysozyme een belangrijk bestanddeel van onder meer traanvocht, slijm en speeksel. Net als BSA (*bovine serum albumin*) en immunoglobulin G wordt het vaak gebruikt als referentie-eiwit voor het maken van een ijklijn.



Figuur 5.x Een voorbeeld van een ijklijn voor de S+G assay.

De ijklijn is de grafiek van de absorptie van de lysozyme-oplossingen met S+G reagens tegen de concentraties van de oplossingen. De concentraties van de onbekende GFP, YFP en CFP oplossingen zijn vervolgens af te lezen in de grafiek aan de hand van hun absorptie-waarden. Het verband tussen absorptie (binding van Coomassie Brilliant Blue) en eiwit-concentratie is niet helemaal lineair. Vooral bij hoge eiwit-concentraties buigt de grafiek af. Dit is onder meer het gevolg van verstrooiing en de beperkte gevoeligheid van de spectrometer bij hoge concentraties (zie proef 1), maar het komt ook doordat de bindingseigenschappen van de kleurstof enigszins concentratie-afhankelijk zijn.

Alle verdunningen en bepalingen worden uitgevoerd in duplo, en om achtergrond-effecten (zoals eiwit-verontreiniging in het reagens) uit te schakelen maken we tevens een blanco, met reagens maar zonder eiwit.

5.4 Handleiding

Benodigheden

- lysozyme oplossing $1.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, voor de ijklijn
- S+G reagens: 0.06% Servablue (Coomassie Brilliant Blue) G250 in 3% perchloorzuur

- oplossingen met onbekende concentraties CFP, GFP en YFP
- 1 ml cuvetten, pipetten en puntjes, millimeterpapier, viltstift

Werkwijze

- Pipetteer achtereenvolgens eiwit-oplossing, demiwater (stevig op eiwit pipetteren) en S+G reagens in de 1 ml cuvetten, volgens het volgende pipetteschema:

Cuvetten met lysozyme voor de ijklijn				
<i>cuvet no.</i>	<i>μl lysozyme</i>	<i>μl water</i>	<i>μl S+G reagens</i>	<i>concentratie lysozyme in cuvet (μg·ml⁻¹)</i>
1	0 (blanco)	500	500	...
2				
3	5	495	500	...
4				
5	10	490	500	...
6				
7	15	485	500	...
8				
9	20	480	500	...
10				
Cuvetten met onbekende concentratie monster				
<i>cuvet no.</i>	<i>μl monster</i>	<i>μl water</i>	<i>μl S+G reagens</i>	<i>concentratie eiwit in cuvet (μg·ml⁻¹)</i>
11	10 μl CFP	490	500	...
12				
13	20 μl CFP	480	500	...
14				
15	10 μl GFP	490	500	...
16				
17	20 μl GFP	480	500	...
18				
19	10 μl YFP	490	500	...
20				
21	20 μl YFP	480	500	...
22				

- Meet de absorptie van alle cuvetten bij 595 nm met een spectrofotometer. Gebruik één van de blanco's als referentie. Noteer alle meetwaarden.

- **Bewaar de originele monsters met CFP, GFP en YFP voor de gelelectroforese-analyse (proef 6)!** Ruim de rest van de spullen op, en giet de cuvetten leeg in het daarvoor bestemde afvalvat.

Uitwerking

- Bereken de concentraties ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) lysozyme in de cuvetten aan de hand van het pipetteerschema en de originele concentratie. Laat de waardes controleren door de assistent.
- Maak een ijklijn-grafiek door de absorptiewaarden van de lysozyme-oplossingen (y-as) uit te zetten tegen de concentraties (x-as, in $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) op grafiekpapier. Duplo-waarden moeten hier niet gemiddeld worden.
- Middel de absorptiewaarden van de CFP, GFP en YFP oplossingen. Gebruik de ijklijn om de concentraties in de cuvetten te bepalen.
- Bereken de concentraties CFP, GFP en YFP in de oorspronkelijke buizen in $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.
- Zorg dat alle resultaten en de ijklijn genoteerd zijn in het labjournaal.

5.5 Vragen

1. Waarom gebruik je gemiddelde duplo-meetwaardes voor de onbekende oplossingen, maar gebruik je de losse duplo-waarden voor het maken van de ijklijn?
2. Waarom is het belangrijk om alle monsters te meten in hetzelfde medium en bij gelijke pH?
3. De golflengtes die niet geabsorbeerd worden bepalen de kleur van een stof in oplossing. Verklaar waarom de meeste eiwitten wit of doorzichtig (kleurloos) zijn.
4. Geldt bij deze bepaling de wet van Lambert-Beer (zie proef 1)? Leg uit.

5.6 Referenties

Bradford, M. M. (1976), 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry* **72**(1-2), 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

Sedmak, J. J. & Grossberg, S. E. (1977), 'A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250', *Analytical Biochemistry* **79**(1-2), 544–552. DOI: 10.1016/0003-2697(77)90428-6

Stoscheck, C. M. (1990), 'Quantitation of protein', *Methods in Enzymology* **182**, 50–68.

Voet, Voet & Pratt, 'Fundamentals of Biochemistry', 3rd edition, Section **5.2A** (*Protein Purification and Analysis*), Box **4-3** (*Green Fluorescent Protein*), Section **11-4** (*Lysozyme*).

6. Gelelectroforese

6.1 Inleiding

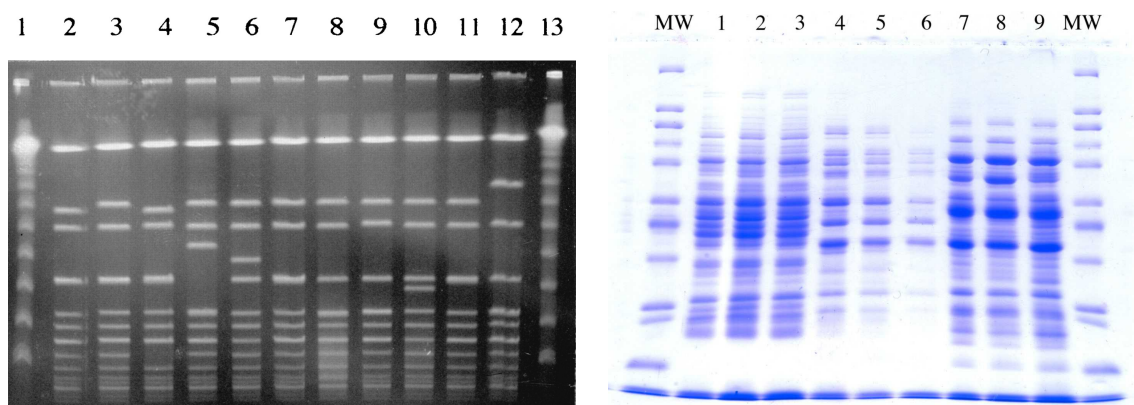
Zonder twijfel een van de meest gebruikte analysemethoden voor biologische mengsels is electroforese. Bij deze techniek worden componenten (DNA/RNA-moleculen, eiwitten) van elkaar gescheiden door middel van een elektrisch veld. Scheiding gebeurt meestal op basis van grootte en/of lading, maar soms ook op complexere criteria zoals structuur. Na scheiding is eventueel verdere analyse mogelijk (meestal met *blotting*-technieken). Electroforese vindt meestal plaats in een gel-medium. Twee belangrijke toepassingen van deze gelelectroforese zijn analyse van DNA en identificatie van eiwitten.

Waarschijnlijk de meeste bekende toepassing van gelelectroforese is het maken van DNA profielen in forensisch onderzoek. Hierbij worden minieme hoeveelheden DNA afkomstig van bijvoorbeeld haren, huidcellen of sperma vermeerderd met behulp van een PCR (*polymerase chain reaction*). Vervolgens wordt het DNA in fragmenten van verschillende lengte geknipt met restrictie-enzymen. Deze fragmenten worden voorzien van een kleurstof en gescheiden met gelelectroforese. Het resulterende patroon is uniek voor ieder individu, en kan dus gebruikt worden om aan te tonen of het gevonden DNA toebehoort aan de verdachte van een misdrijf. Of om te controleren wie de biologische ouders van een kind zijn.

In het recente verleden werden ook DNA-sequenties nog handmatig uitgeplozen met behulp van gelelectroforese. Tegenwoordig is dat proces deels geautomatiseerd met de komst van DNA-sequencers, maar ook deze werken intern nog steeds op basis van electroforese.

Een andere belangrijke toepassing is de identificatie van eiwitten. Bijvoorbeeld antistoffen of prionen in bloed, om te kijken of mensen of dieren besmet zijn (geweest) met bepaalde ziekteverwekkers. Bovendien kan het 'eiwitbeeld' van het bloed informatie geven over in welk ziekte-stadium iemand zich bevindt. Tenslotte is gelelectroforese belangrijk voor identificatie van eiwitten in metabolische processen, en wordt het veel gebruikt als *protein purity assay*.

In deze proef zullen we kennis maken met een van de meest gebruikte vormen van gelelectroforese, SDS-PAGE. We zullen deze techniek gebruiken voor een relatief eenvoudige toepassing, om de molecuulmassa van de eiwitten uit proef 5 te bepalen.



Figuur 6.1 Links een DNA-profiel van *Staphylococcus aureus* bacteriën, geïsoleerd uit vijf verschillende infectie-sites (rijen 2-11, in duplo). Rechts een SDS-PAGE eiwit-profiel van drie verschillende soorten melkzuur-bacteriën (in triplo). In beide profielen heeft links en rechts een rij met marker-moleculen meegelopen. *Uit:* Booth et al. (2001) en Piraino et al. (2002).

6.2 Achtergrond en theorie

Principe

Letterlijk betekent elektroforese het voortbewegen van deeltjes door elektrische kracht. In een elektrisch veld zullen negatief geladen deeltjes zich bewegen richting de positieve pool (de anode), en positieve deeltjes zich bewegen richting de negatieve pool (de kathode). De snelheid van beweging neemt toe met de lading van de deeltjes en de sterkte van het veld. Dit levert ruimtelijke scheiding op basis van lading: verschillend geladen deeltjes bewegen met verschillende snelheden, hun onderlinge afstand neemt dus geleidelijk toe. Afhankelijk van het medium waarin de deeltjes zich bewegen kan grootte en vorm (structuur) ook van invloed zijn op de bewegingssnelheid.

DNA-ketens zijn in principe negatief geladen vanwege hun negatief geladen fosfaat-deoxyribose 'ruggengraat'. Bij eiwitten is het wat ingewikkelder, aangezien deze zijn opgebouwd uit aminozuren die zowel positief als negatief geladen kunnen zijn. Bovendien is de lading van deze aminozuren ook afhankelijk van pH. Dit komt doordat ieder molecuul een zogenaamd *isoelectrisch punt* (pI) heeft, de pH-waarde waarbij de netto lading van het molecuul nul is. Als de pH lager is dan de pI van een eiwit dan wordt het positief geladen door binding van H⁺-ionen. Als de pH hoger is dan de pI dan wordt het eiwit negatief geladen, omdat het H⁺-ionen kwijtraakt aan de omgeving.

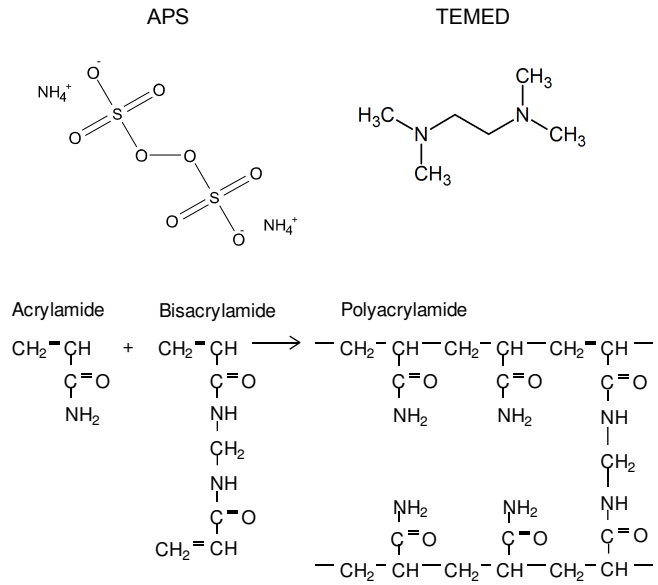
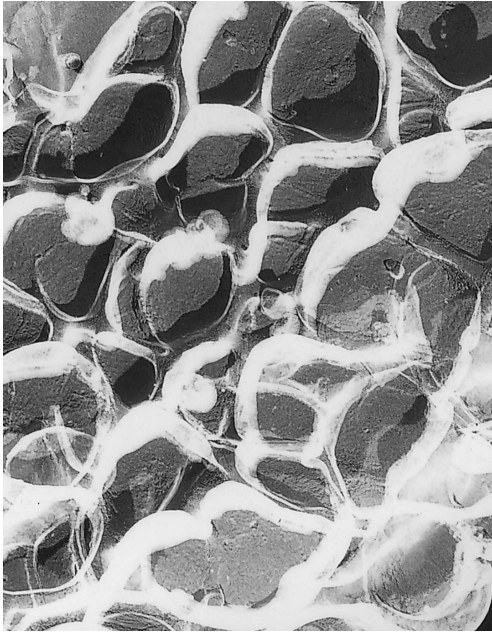
Lading van moleculen in een elektrisch veld is de drijvende kracht bij elektroforese, maar afhankelijk van het medium kunnen andere factoren ook de snelheid van het molecuul beïnvloeden. In het geval van een gel-medium bewegen geladen moleculen zich door een netwerk van ketens, een soort moleculaire zeef. Bij lange 'staafvormige' moleculen zal de migratiesnelheid dus ook afhangen van de lengte van het molecuul.

Naast lengte is ook de secundaire, tertiaire en quaternaire structuur van invloed op de snelheid. Als we macromoleculen enkel willen scheiden op lading en/of grootte dan moeten de moleculen eerst gedeneatureerd worden. Verhitting, toevoeging van detergens en/of toevoeging van een sterke reductor zorgen ervoor dat ketens van DNA en eiwitten ontvouwen worden en dat eventuele complexen uiteenvallen in subunits.

Medium

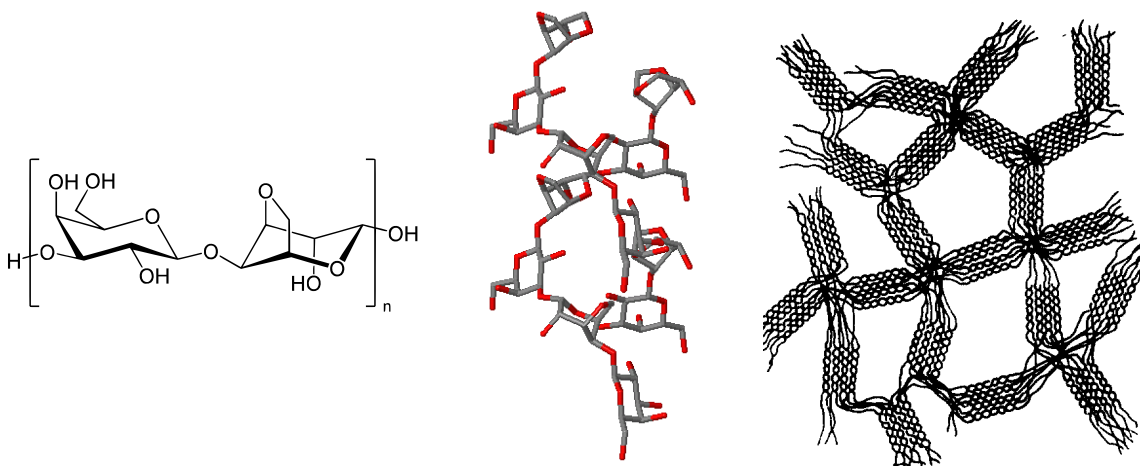
Het medium moet ervoor zorgen dat moleculen zich kunnen voortbewegen met voldoende verschillende snelheden, zodat een goede scheiding plaatsvindt. Het moet vast genoeg zijn, zodat de moleculen niet meteen diffunderen, maar ook poreus zodat ze zich wel kunnen bewegen. De eerste gelelectroforese methodes vanaf ongeveer 1930 gebruikten gel op basis van sucrose als medium, en vanaf de jaren '50 ook gel op basis van zetmeel. In 1959 werden polyacrylamide-gels geïntroduceerd, en vanaf de jaren '70 worden ook agarose-gels gebruikt, met name voor DNA.

Polyacrylamide-gel wordt het meest gebruikt als medium voor eiwit-elektroforese. Het bestaat uit acrylamide-ketens, die kruislings verbonden zijn door methyleenbisacrylamide ("bis") moleculen. Polymerisatie van de gel wordt op gang gebracht door toevoeging van APS (ammonium persulfaat, een sterke radiacaalvormende oxidator) en TEMED (tetramethylethyleendiamine, nodig als katalysator). De voordelen van acrylamide-gel zijn dat het hitte-bestendig is en dat de grootte van de poriën tot op zekere hoogte te regelen is door de verhouding acrylamide (3-30%) ten opzichte van bisacrylamide te variëren. Meer acrylamide betekent dat er relatief minder crosslinks zijn, dus de poriën zullen dan kleiner worden. Het grootste nadeel van acrylamide is dat het giftig is: het is een sterk neurotoxicum en bovendien licht carcinogeen.



Figuur 6.2 Links een *Transmission Electron Microscope* (TEM) foto van de structuur van polyacrylamide-gel. Rechts de sterke oxidator ammonium persulfaat, de katalysator TEMED, en de polymerisatie van acrylamide en methyleenbisacrylamide.

Bij polyacrylamide-gel is de maximale grootte van de poriën beperkt, bij minder dan ongeveer 3% acrylamide zou de gel namelijk vloeibaar worden. Voor elektroforese met kleine DNA-fragmenten wordt acrylamide wel gebruikt, maar voor DNA-moleculen zwaarder dan 200 kDa wordt meestal agarose gebruikt als medium. Dit is een natuurlijke polysaccharide dat onderdeel uitmaakt van agar, het materiaal waarop ook bacteriën gekweekt worden. Het werd oorspronkelijk gewonnen uit rode zeevieren van de familie *Rhodophyceae*, maar wordt tegenwoordig synthetisch geproduceerd.



Figuur 6.3 Agarose (links) is een suiker-polymeër, en vormt onder normale omstandigheden een dubbele helix (midden, PDB: 1aga). Agarose-gel bestaat uit dikke, gekoppelde bundels van agarose-helices, schematisch weergegeven in het figuur rechts. In realiteit kunnen deze bundels 10-10000 dubbele helices per bundel bevatten.

Kleuring

Voor het bepalen van hun positie op de gel moeten macromoleculen na (of soms voor) electroforese zichtbaar gemaakt worden. Dit gebeurt meestal met behulp van kleuring (*staining*). Voor DNA moleculen wordt traditioneel de (kankerverwekkende) kleurstof ethidium bromide gebruikt, die sterk fluorescent wordt na binding aan DNA. Voor eiwitten wordt meestal Coomassie Brilliant Blue gebruikt (zie proef 5). Echter, als eiwitten fluorescent zijn, of gebonden zijn aan fluorescente markers dan kunnen ze uiteraard ook direct zichtbaar gemaakt worden zonder kleuring. Voor het volgen van de voortgang tijdens electroforese, en voor het maken van een ijklijn erna, zijn kant-en-klaar gekleurde marker-moleculen (ijkeiwitten) verkrijgbaar met een bekende molecuulmassa.

Voor kleuring met Coomassie Brilliant Blue wordt de gel na electroforese enige tijd (10-30 minuten) in een oplossing gelegd van 0.1% Coomassie in 40% methanol en 10% azijnzuur. De eiwitbandjes kleuren hierbij blauw, echter de gel helaas ook. De gel moet dus weer ontkleurd worden met met 40% methanol en 10% azijnzuur, waarna de bandjes zichtbaar worden.

Technieken voor eiwitscheiding

Isoelectric Focusing (IEF) is een electroforese-techniek waarbij moleculen enkel gescheiden worden op lading. Bij eiwitten wordt de lading vooral bepaald door de relatieve aanwezigheid van zure (Asp, Glu) versus basische (Arg, Lys, His) aminozuren. Scheiding gebeurt door het aanleggen van zowel een elektrisch veld als een pH gradiënt over de gel. Bij de anode (+) heerst een lage pH. Deze is beneden het isoelectrisch punt (pI) van eiwitten. Hierdoor zijn alle moleculen positief geladen, en bewegen ze zich richting de kathode (-). Naarmate de moleculen dichterbij de kathode komen neemt de pH toe, en dus neemt de lading van het eiwit af. Zodra de bereikte pH gelijk is aan de pI van een bepaald eiwit zal de lading neutraal worden en het molecuul dus niet verder bewegen.

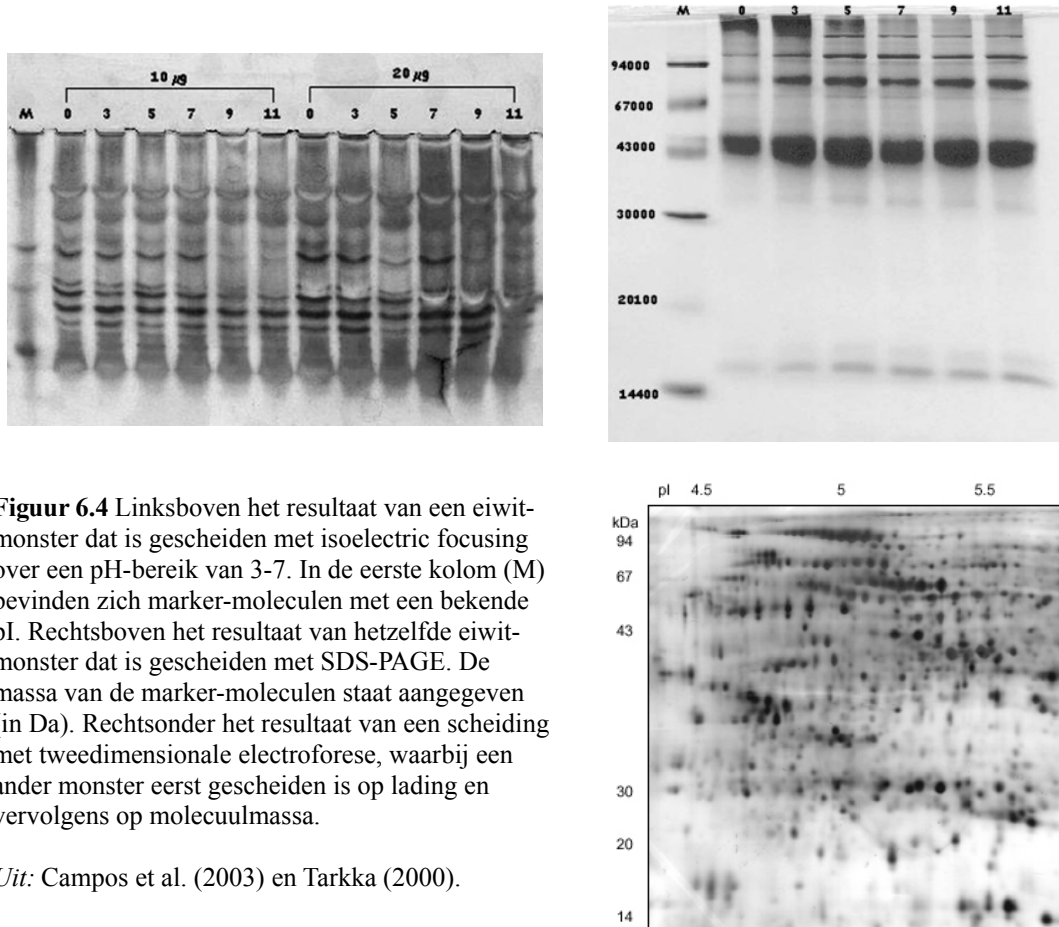
SDS-PAGE is een electroforese-techniek waarbij moleculen enkel gescheiden worden op grootte (massa). De term staat voor *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*. SDS is ook wel bekend onder de naam natrium lauryl sulfaat. Het is een van de meest gebruikte detergentia (aniogene oppervlakte-actieve stoffen) en komt voor in allerlei huishoudelijke producten zoals zeep, shampoo, tandpasta en scheerschuim. Toevoeging van SDS aan een eiwit-oplossing zorgt voor denaturatie (het ontvouwen van de tertiaire eiwit-structuur). Bovendien bindt SDS aan eiwitten in een min of meer vaste verhouding (ongeveer 1.4 g SDS per gram eiwit), waardoor de eiwitten een negatieve lading krijgen evenredig met hun grootte. Vaak wordt naast SDS nog een sterke reductor toegevoegd, bijvoorbeeld DTT (ditiotreitol). Dit wordt wel *reducing SDS-PAGE* genoemd. DTT zorgt voor verdere denaturatie van de eiwitten door het verbreken van zwavelbruggen (disulfidebindingen).

Native PAGE is een term die veel gebruikt wordt voor polyacrylamide gelelectroforese bij een vaste pH en zonder toevoeging van SDS of DTT. Hierbij blijven de tertiaire structuur en eventuele complexen van het eiwit dus in principe intact. Dit maakt verdere analyse mogelijk na scheiding, bijvoorbeeld met behulp van enzymen of immunoassays. Scheiding gebeurt op basis van zowel grootte als structuur, en moet worden uitgevoerd bij een hoge pH (> 8.0) zodat alle eiwitten negatief geladen zijn.

Tweedimensionale gelelectroforese (2-DE) is een combinatie van twee van de hierboven beschreven technieken. In de eerste stap worden eiwitten gescheiden met bijvoorbeeld isoelectric focussing of met native PAGE. In de tweede stap wordt meestal SDS toegevoegd en worden de eiwitten gescheiden op grootte. De richting van de tweede scheiding is loodrecht op de eerste, dus de uiteindelijke tweedimensionale positie op de gel geeft een unieke combinatie van eigenschappen weer (bijvoorbeeld lading en grootte of structuur en grootte).

Bij **gradiëntgelen** varieert percentage acrylamide over de gel. Hierdoor neemt de grootte van de

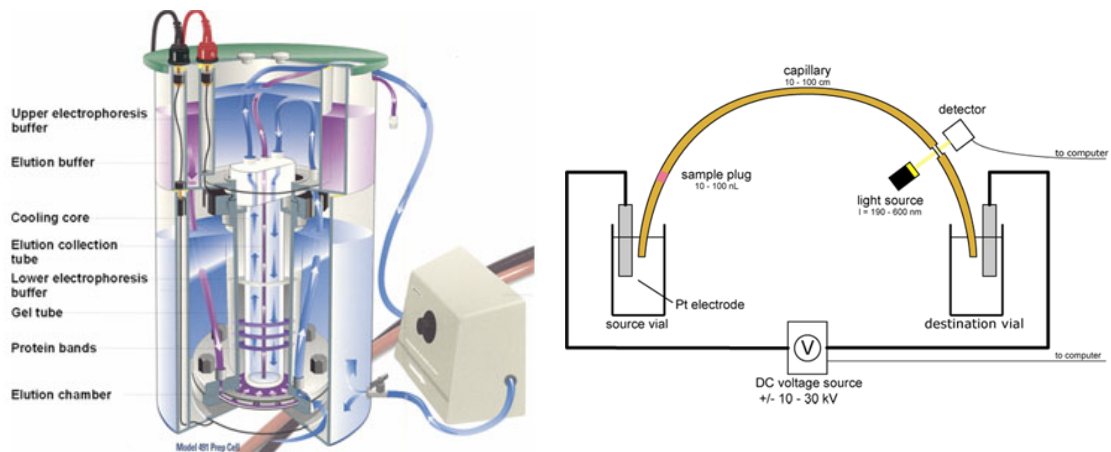
poriën gelijkelijk af. Gradiëntgelen worden bijvoorbeeld gebruikt als een eiwit zowel grote als kleine subunits heeft (denk aan ATPase).



Figuur 6.4 Linksboven het resultaat van een eiwitmonster dat is gescheiden met isoelectric focusing over een pH-bereik van 3-7. In de eerste kolom (M) bevinden zich marker-moleculen met een bekende pI. Rechtsboven het resultaat van hetzelfde eiwitmonster dat is gescheiden met SDS-PAGE. De massa van de marker-moleculen staat aangegeven (in Da). Rechtsonder het resultaat van een scheiding met tweedimensionale electroforese, waarbij een ander monster eerst gescheiden is op lading en vervolgens op molecuulmassa.

Uit: Campos et al. (2003) en Tarkka (2000).

Naast bovengenoemde technieken bestaan er nog een aantal meer geavanceerde methodes voor eiwit-electroforese. Voorbeelden hiervan zijn *QPNC-PAGE* (voor het scheiden van metalloproteïnen of grotere hoeveelheden oplossing), en extreem hoge-resolutie methodes zoals *capillaire electroforese* (CE) en *isotachoforese* (ITP). Capillaire electroforese wordt onder meer gebruikt in de meeste moderne DNA sequencers. De methode is zo gevoelig dat ze in staat is om eiwitten te scheiden die slechts verschillen in één aminozuur!



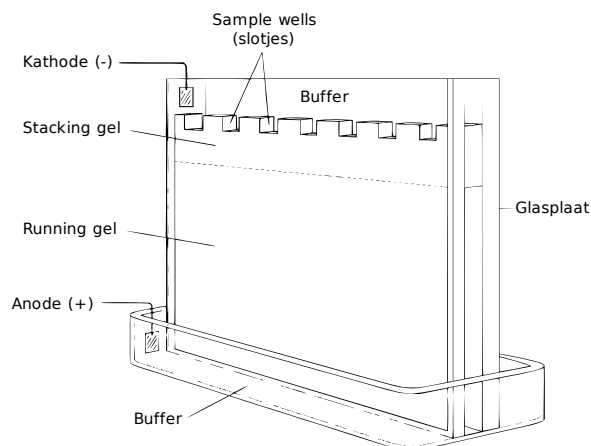
Figuur 6.5 Links een zogenaamde “Prep Cell” voor continue preparatieve elektroforese (QPNC-PAGE). Rechts schematisch het principe van capillaire elektroforese.

6.3 Over de proef

Met behulp van de *reducing SDS-PAGE* methode gaan we de molecuulmassa bepalen van de drie fluorescerende eiwitten GFP, YFP en CFP uit proef 5.

PAGE gel

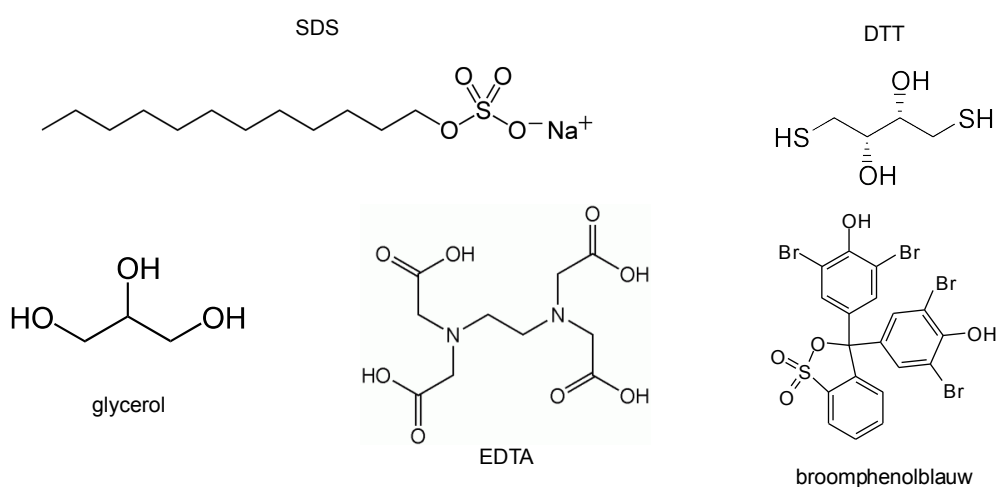
Bij de standaard SDS-PAGE wordt de gel tussen twee glasplaten gegoten. De gel bestaat uit twee delen, een zogenaamde *stacking gel* (ook wel *spacer gel*) waar de samples op worden gepipetteerd, en een *running gel* (ook wel *resolving gel* of *separating gel*) waarin de daadwerkelijke scheiding plaatsvindt. De stacking gel heeft grotere poriën dan de running gel, en dient om de eiwitten te concentreren in smalle bandjes voordat de daadwerkelijke scheiding begint. Op de stacking gel wordt een *kam* geplaatst, die slotjes in de gel maakt waarin de monsters makkelijk gepipetteerd kunnen worden. De afstand tussen de glasplaten is te variëren, een dikkere gel maakt het mogelijk om meer materiaal te scheiden maar geeft een slechter resultaat. Na het gieten van de gel wordt deze in een bak met elektroforesebuffer geplaatst en worden de samples in de slotjes op de stacking gel gepipetteerd (met een speciale lange, dunne Gelsaver tip). In de bak wordt de gel blootgesteld aan een elektrisch veld van 300 V, en zullen de samples de running gel in lopen.



Figuur 6.6 Een eenvoudige elektroforese-bak met daarin een PAGE gel.

Sample buffer

Voordat ze worden opgebracht worden de te analyseren monsters opgelost in een sample-buffer. Deze bevat SDS en DTT, en zorgt dus voor denaturatie en een negatieve lading van de eiwitten. Daarnaast bevat de sample-buffer glycerol, EDTA en broomphenolblauw. Glycerol wordt in laboratoria veel gebruikt om eiwitoplossingen te conserveren in de vriezer, maar dient hier vooral om de samples te verzwaren zodat ze goed in de slotjes zakken. EDTA is een metaalchelator, het bindt tweewaardige metaal-kationen. Dit remt afbraak van eiwitten door *metalloprotease*-enzymen in de samples, die voor hun werking afhankelijk zijn van metaal-ionen. Broomphenolblauw (BPB) tenslotte is een kleurstof. Deze kleurstof heeft een kleine molecuulmassa en is negatief geladen bij een pH boven 4.6. Broomphenolblauw zal dus voor de meeste eiwitten uit lopen in de gel, en kan daardoor gebruikt worden om de voortgang van de elektroforese in de gaten te houden.



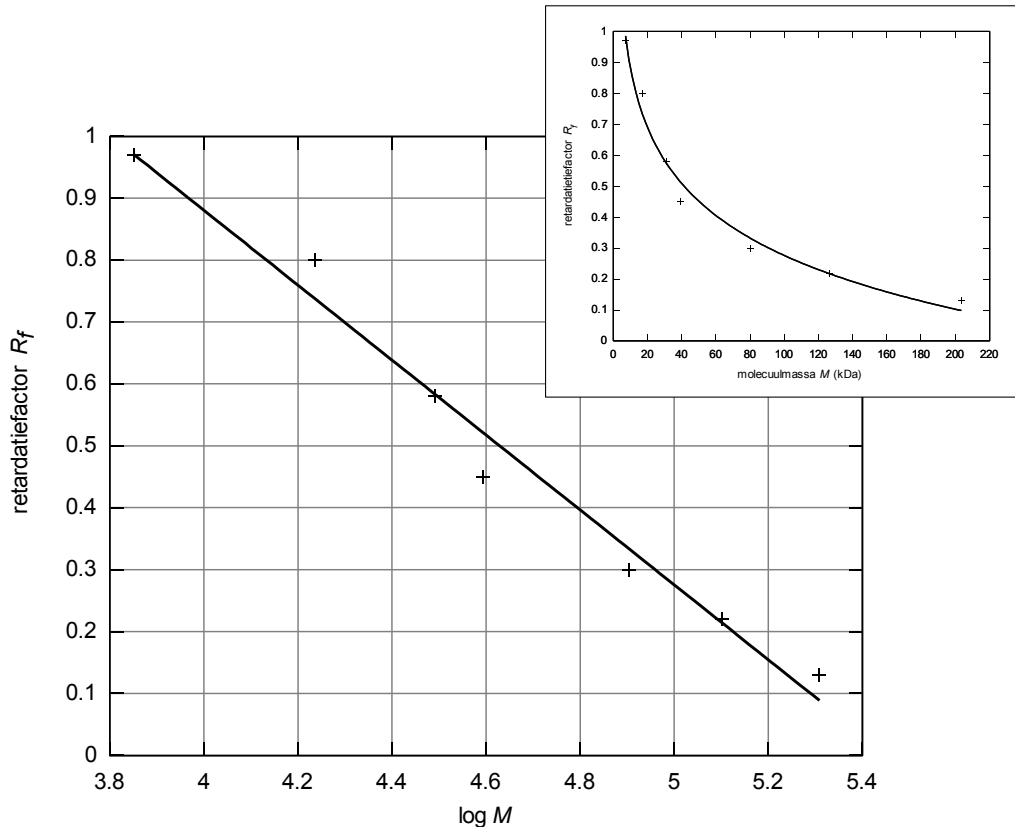
Figuur 6.7 Belangrijke stoffen in de sample-buffer voor SDS-PAGE.

Bepaling van molecuulmassa

Met SDS-PAGE worden de eiwitten op de gel gescheiden op grootte, en dus op molecuulmassa. Echter, om de molecuulmassa te kunnen bepalen hebben we een referentie nodig. Hiervoor gebruiken we kant-en-klaar gekleurde marker-eiwitten, met een bekende massa. De relatieve afstand van de eiwit-bandjes ten opzichte van de totale lengte van de gel geeft de *relatieve mobiliteit* van ieder eiwit. Dit wordt uitgedrukt in de *retardation factor* (ook wel *retention factor*) R_f . In tegenstelling tot wat die naam suggereert is dit een maat voor de migratiesnelheid van een eiwit, genormaliseerd naar de lengte van de gel.

$$R_f = \frac{\text{migratie-afstand eiwit}}{\text{totale migratie-afstand oplossing}}$$

Deze maat is afkomstig uit de chromatografie, waar de R_f -waarde specifiek is voor een bepaalde stof (onder gegeven omstandigheden). Bij SDS-PAGE is de R_f -waarde specifiek voor een bepaalde molecuulmassa. Echter, het verband tussen molecuulmassa en relatieve mobiliteit in de gel is niet lineair. Grote moleculen zijn exponentieel langzamer dan kleine moleculen, dus de R_f -waarde van een eiwit is recht evenredig met $\ln(M)$, het natuurlijk logaritme van de molecuulmassa. Door de R_f -waardes van de marker-eiwitten uit te zetten tegen $\ln(M)$ krijgen we een ijklijn. Deze ijklijn kunnen we vervolgens gebruiken om de molecuulmassa's van de overige eiwitten af te lezen.



Figuur 6.8 De retardatiefactor R_f uitgezet tegen de massa van markermoleculen (rechtsboven). Omdat kleinere moleculen relatief veel sneller door de gel migreren is dit verband logaritmisch. Daarom zetten we voor de ijklijn meestal R_f uit tegen het logaritme van de molecuulmassa (linksonder), of gebruiken we een logaritmische schaal voor de x-as.

6.4 Handleiding

Benodigheden

Voor het maken van de gel staan de volgende oplossingen klaar:

- resolutiebuffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)
- stackbuffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)
- acrylamide / bisacrylamide oplossing (AA-bisAA)
(40% acrylamide, de verhouding acrylamide tot bisacrylamide is 29 : 1)
- SDS 10% (10 g natrium dodecyl sulfaat per 100 ml demiwater)
- APS 10% (10 g ammonium persulfaat per 100 ml demiwater)
- TEMED (tetramethylethyleendiamine, ruikt enigszins onprettig naar vis)

Voor het vullen van de elektroforesebak staat een buffer-oplossing klaar:

- elektroforesebuffer (pH 8.0), bestaande uit:
 - 3.0 g Tris

- 14.4 g glycine
- 10 ml SDS (10%)

Voor het oplossen van de eiwit-samples staat eveneens een buffer-oplossing klaar:

- samplebuffer (5x geconcentreerd), bestaande uit:
 - 250 mM Tris (pH 8)
 - 5% SDS
 - 25 mM DTT (ditiotrietol)
 - 50% glycerol
 - 2.5 mM EDTA (ethyleendiaminetetraazijnzuur)
 - 0.002% BPB (broomphenolblauw)

Verder is nodig:

- eiwit-samples voor analyse (CFP, GFP en YFP uit proef 5)
- marker-eiwitten ter referentie
- glasplaten, houder, kam, electroforesebak
- pipetten, puntjes, Gelsaver-tips
- linealen (normaal en fluoriserend)

Werkwijze

- Controleer allereerst of de CFP, GFP en YFP samples verdund moeten worden. We gebruiken een gel met een dikte van 0.75 mm. Per slotje kan in dit geval maximaal 50 µg eiwit opgebracht worden, anders loopt de gel dicht. Gebruik de resultaten van proef 5 om te berekenen hoeveel microgram eiwit er in 20 µl sample zit. Bereken de benodigde verdunning indien dit meer is dan 50 µg.

We beginnen vervolgens met het mengen en gieten van de running gel (5 ml, 12% acrylamide) en de stacking gel (2.5 ml, 4% acrylamide):

- Meng onderstaande oplossingen voor de running gel. APS en TEMED zorgen voor polymerisatie, voeg deze dus als laatste toe. **Let op: acrylamide is giftig!** Werk dus voorzichtig en draag handschoenen.
 - 2.175 ml demiwater
 - 1.25 ml resolutiebuffer
 - 1.5 ml AA-bisAA
 - 50 µl SDS 10%
 - 25 µl APS 10%
 - 10 µl TEMED
- Pipetteer met een P1000 het running gel mengsel tussen de glasplaten (0.75 mm dik), tot ongeveer 2 cm van de bovenkant. Pipetteer met een P200 voorzichtig een laagje

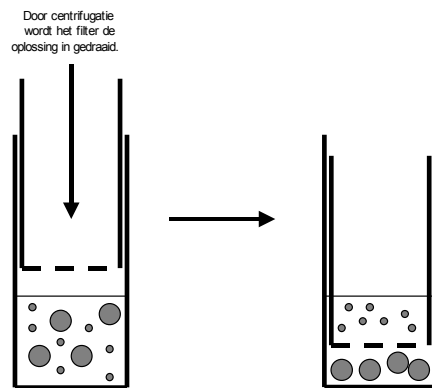
- demiwater op het gel-mengsel, zodat het oppervlak mooi glad wordt.
- Als de running gel gepolymeriseerd is kun je de stacking gel mengen:
 - 1.59 ml demiwater
 - 0.63 ml stackbuffer
 - 0.25 ml AA-bisAA
 - 25 μ l SDS 10%
 - 18 μ l APS 10%
 - 6 μ l TEMED
 - Pipetteer met een P1000 het stacking gel mengsel op de running gel, en schuif voorzichtig de kam met slotjes tussen de glasplaten.
 - Tijdens de polymerisatie van de stacking gel kunnen de te analyseren eiwit-samples verdund worden met sample buffer. Bepaal op basis van je eerdere berekening welke verdunning je nodig hebt. Ieder sample moet een totaalvolume krijgen van 25 μ l, en moet minimaal 5 μ l sample buffer bevatten.
 - Als de stacking gel gepolymeriseerd is (bedenk hoe je dit kunt zien!), kan de kam verwijderd worden. De gel wordt in de houder en vervolgens in de electroforesebak gemonteerd. Vul de twee compartimenten van de bak geheel met electroforesebuffer.
 - Vul met een Gelsaver-tip de slotjes van de gel met de verdunde eiwit-samples. Gebruik 10-15 μ l sample per slotje. Vergeet niet de slotnummers en samples in je labjournaal te noteren.
 - Vul een slotje met 5 μ l marker-eiwit oplossing.
 - Doe de deksel op de electroforesebak sluit de anode (rood, +) en kathode (zwart, -) aan en stel het voltage in op 300 V.
 - Schakel na ongeveer 25 minuten stroom uit en controleer de gel. Als het broomphenolblauw voldoende ver richting de anode is gemigreerd kan de gel tussen de glasplaten uitgehaald worden.
 - Meet de migratie-afstanden van de marker-eiwitten met een liniaal.
 - Meet onder UV-licht de migratie-afstanden van de bandjes met CFP, GFP en YFP met een fluoriserende liniaal.

Uitwerking

- Bereken de *retention factor* R_f voor alle eiwitten. Deze waarden geven de relatieve mobiliteit van ieder eiwit.
- De relatieve mobiliteit van een eiwit is bij SDS-PAGE evenredig met het logaritme van zijn molecuulmassa (M , meestal uitgedrukt in kiloDalton). Maak op grafiekpapier een plot van R_f tegen $\ln(M)$ van de marker-eiwitten en teken een ijklijn.
- Bepaal met behulp van de ijklijn de molecuulmassa van de eiwitten GFP, CFP en YFP in kiloDalton (kDa).
- Zorg dat alle resultaten en de ijklijn genoteerd zijn in het labjournaal.

6.5 Vragen

1. Er bestaan units voor ultrafiltratie of bioscheiding. Een unit bestaat uit twee buisjes, een gewone buis en een binnenbuis, de binnenbuis heeft als bodem een membraan. De poriegrootte van de membraan bepaalt welke moleculen doorgelaten kunnen worden. Ionen en moleculen kleiner dan een bepaald volume (evenredig met massa) kunnen de membraan passeren. Eiwitten van verschillende grootte in één oplossing kunnen hierdoor gescheiden worden. Ook wordt dit systeem toegepast voor het concentreren van (met name) eiwitten.



Er zijn filters met poriën voor moleculen van 5, 10, 30, 50 en 100 kDa te koop. Een onderzoekster krijgt een mengsel van GFP, CFP en YFP. Kan ze de drie eiwitten scheiden met behulp van ultrafiltratie en zo ja welke filters heeft ze dan nodig?

2. YFP en CFP zijn kunstmatige mutanten van het originele Green Fluorescent Protein GFP. De genen die coderen voor deze eiwitten verschillen slechts in enkele puntmutaties van elkaar. Hoe kun je dit terugzien in de resultaten?
3. Gelelectroforese en gelfiltratie (proef 4) zijn beiden methodes die gebruikt kunnen worden om biologische mengsels te scheiden op molecuulmassa. Vergelijk de methodes, voor welke toepassingen is gelfiltratie het meest geschikt? En voor welke toepassingen kun je beter gelelectroforese gebruiken?

6.6 Referenties

Smithies, O. (1955), 'Early Days of Gel Electrophoresis', *Genetics* **139**(1), 1-4.

Shapiro, A. L.; Viñuela, E. & Maizel, J. V. (1967), 'Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.', *Biochem Biophys Res Commun* **28**(5), 815—820.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987), 'Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa', *Analytical Biochemistry* **166**(2), 368—379.

Schägger, H.; Aquila, H. & Von Jagow, G. (1988), 'Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis', *Analytical Biochemistry* **173**(1), 201—205.

Schägger, H. (2006), 'Tricine-SDS-PAGE', *Nat. Protocols* **1**(1), 16—22.

Voet, Voet & Pratt, 'Fundamentals of Biochemistry', Section **5-2D** (*Protein Purification and Analysis*), Section **24-3** (*Fractionation of Nucleic Acids*).

Veiligheids- en Milieuvoorschriften

Neem kennis van de blauwe borden met voorschriften die op iedere practicumzaal hangen. Voor de volledige veiligheids- en milieuvoorschriften van dit practicum wordt verwezen naar de Blackboard-site voor deze cursus, onder *Cursusinformatie*. Op deze site is ook een instructie-video over laboratoriumveiligheid te vinden.

Bij calamiteiten

- Waarschuw altijd direct de practicumleiding of je assistent (ook bij kleine ongelukken)!
- **Het algemeen alarmnummer van de VU is: 222222**
Op iedere zaal hangt een telefoon waarmee je dit alarmnummer kunt bellen. Je wordt dan direct doorverbonden met de meldkamer, die eventueel hulpverleners kan sturen.
- In gevallen waarbij geen direct gevaar dreigt en de practicumleiding onbereikbaar is, kun je de facilitaire helpdesk bellen: 85888
- Bij de telefoon naast de ingang van de O-nul zaal hangt een lijst met tracer- of telefoonnummers van docenten/assistenten met BHV/EHBO training.

Praktische informatie

- **Organisatie cursus en practicum:** Marijke Scholts, 87173
- **Contactpersonen veiligheid bij practica:**
 - W.N.M. Reijnders (ARBO- en milieucoördinator), 77181
 - K. Raaijmakers (Hoofd Onderwijsbureau), 87167
- **Contactpersoon practicumzalen:** Fred Wolff
- Je kunt met vragen uiteraard ook altijd terecht bij de practicum-assistenten.